

GRACIENE ARAUJO DA SILVA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ÁCIDO FUMARPROTOCETRÁRIO
SOBRE A VIABILIDADE E AS FUNÇÕES DE MACRÓFAGOS
PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS DA LINHAGEM SWISS**

Brasília

2012

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ÁCIDO FUMARPROTOCETRÁRICO
SOBRE A VIABILIDADE E AS FUNÇÕES DE MACRÓFAGOS
PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS DA LINHAGEM SWISS

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Médicas pelo programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade de Brasília

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Selma Aparecida Souza Kückelhaus

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Kelly Grace Magalhães

Brasília

2012

Dedico este trabalho às pessoas mais importantes da minha vida. Meu pai, pela dedicação que sempre ofereceu às filhas, *in memoriam*. À minha mãe pelo apoio e incentivo, à minha irmã por acreditar em meu potencial e à minha filha, grande amor da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pela maravilhosa oportunidade de viver, aprender e crescer.

À Prof.^a Dr.^a Selma Aparecida Souza Kückelhaus pela amizade, pela dedicação na arte de transmitir seus sábios conhecimentos, pela disposição em dividi-los e principalmente pela confiança em mim depositada;

À Prof.^a Dr.^a Kelly Grace Magalhães pela atenção, pelos ensinamentos e pela contribuição na conclusão dos trabalhos;

À Prof.^a Dr.^a Maria Imaculada Muniz Junqueira pela disponibilização do laboratório de imunologia celular;

À Prof.^a Dr.^a Eleuza Rodrigues Machado pelo apoio ao permitir o uso dos microscópios do laboratório de Parasitologia;

À Prof.^a Dr.^a Neli Kika Honda e ao Departamento de Química da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul pela disponibilização do ácido fumarprotocetrárico;

À Tatiana Borges pela sua disposição em me ajudar na realização deste trabalho, em especial nos ensaios para avaliação de peróxido de hidrogênio e óxido nítrico;

À Shirley Claudino Pereira Couto por dividir comigo seus conhecimentos em técnicas laboratoriais;

Às amigas Luciana de Magalhães Leite e Daniela Sant'Ana de Aquino pela disposição em ajudar, pelo companheirismo e pelo auxílio na execução dos experimentos;

À minha maravilhosa família, pelo apoio oferecido em todos os momentos;

E a todos que contribuíram direta e indiretamente para a execução e conclusão desse trabalho.

RESUMO

Doenças infecciosas são responsáveis por milhões de mortes em todo o mundo e o uso abusivo de antibióticos para tratamento dessas doenças tem provocado aumento da resistência aos antimicrobianos. O desenvolvimento de novas drogas faz-se necessário e os compostos extraídos de líquens são uma promissora fonte de novos medicamentos, pois têm apresentado forte ação antifúngica e antibacteriana. O ácido fumarprotocetrárico, extraído do líquen *Cladonia verticilaris*, mostrou ser um potente agente antimicrobiano, o que justifica o objetivo deste trabalho que foi avaliar o efeito desse ácido sobre a viabilidade e a função de macrófagos peritoneais de camundongos da linhagem Swiss em ensaios *in vitro*. Para o teste da viabilidade celular utilizou-se o método do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina). A produção de peróxido de hidrogênio foi avaliada pelo teste de oxidação do vermelho de fenol e a de óxido nítrico pela reação de Griess. A capacidade fagocitária foi avaliada utilizando *Saccharomyces cerevisiae*, sensibilizadas ou não com soro de camundongos. Os níveis das citocinas Interleucina-6 (IL-6), Interleucina-10 (IL-10), Interleucina-12 (IL-12), Interleucina-23 (IL-23), proteína quimiotática de monócitos (MCP-1) e fator de necrose tumoral (FNT) foram analisados nos sobrenadantes das culturas celulares por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA – Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay). Todos os ensaios foram efetuados utilizando-se o ácido fumarprotocetrárico nas concentrações de 10, 50 ou 100 µg/mL e os resultados mostraram que as células permaneceram viáveis. O ácido fumarprotocetrárico, nas concentrações testadas, não interferiu com a produção de NO, IL-6, IL-10 e IL-12, mas aumentou a produção de IL-23 e inibiu a produção de MCP-1. Em uma concentração de 10 µg/mL, o ácido inibiu a produção de H₂O₂, mas nas concentrações de 50 ou 100 µg/mL essa produção foi estimulada. O ácido, em uma concentração de 100 µg/mL, inibiu a produção de FNT. Além dos efeitos antimicrobianos já relatados na literatura, o conjunto de resultados obtidos mostrou que o ácido fumarprotocetrárico possui efeitos imunomodulatórios, o que o torna um potencial agente para o desenvolvimento de novos medicamentos.

Palavras-chave: Ácido fumarprotocetrárico, fagocitose, peróxido de hidrogênio, óxido nítrico, citocinas.

ABSTRACT

Infectious diseases are responsible for millions of deaths worldwide and the excessive use of antibiotics to treat these diseases has led to increased antimicrobial resistance. The development of new drugs is necessary and the compounds extracted from lichens are a promising source of new medicaments as they have presented strong antifungal and antibacterial activity. The fumarprotocetraric acid, extracted from the lichen *Cladonia verticilaris*, proved to be a potent antimicrobial agent, justifying the purpose of this study that was to evaluate the effect of this acid on the viability and function of peritoneal macrophages from Swiss mice lineage in *in vitro* tests. For the cell viability test it was used the MTT (3 – (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyl tetrazolium bromide) method. The production of hydrogen peroxide was evaluated by oxidation of phenol red and nitric oxide by Griess reaction. The phagocytic capacity was evaluated using *Saccharomyces cerevisiae*, sensitized or not with serum from mice. The levels of the cytokines Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-10 (IL-10), Interleukin-12 (IL-12), Interleukin-23 (IL-23), monocyte chemotactic protein (MCP-1) and Tumor Necrosis Factor (TNF) were examined in cell culture supernatants by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). All assays were performed using the fumarprotocetraric acid at concentrations of 10, 50 or 100 µg/mL and the results showed that cells remained viable. The fumarprotocetraric acid did not interfere on NO, IL-6, IL-10, IL-12 production but increased IL-23 and inhibited MCP-1 production. At a concentration of 10 µg/mL the acid inhibited H₂O₂ production but at concentrations of 50 or 100 µg/mL this production was stimulated. The acid, at a concentration of 100 µg/mL, inhibited TNF production. In addition to the antimicrobial effects already described in the literature, the set of results obtained showed that fumarprotocetraric acid has immunomodulatory effects, which makes it a potential agent for the development of new drugs.

Keywords: fumarprotocetraric acid, phagocytosis, hydrogen peroxide, nitric oxide, cytokines.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Microestrutura do talo liquênico..... 4
- Figura 2:** Talo do líquen *Cladonia verticillaris*. 5
- Figura 3:** Prováveis vias de produção da maior parte dos metabólitos de líquens. 6
- Figura 4.** Fluxograma dos ensaios in vitro 11
- Figura 5.** Estrutura química do ácido fumarprotocetrárico..... 12
- Figura 6:** Efeito das diferentes concentrações do ácido fumarprotocetrárico sobre células peritoneais de camundongos Swiss (n=8) após incubação por 4 horas na presença de 10 µL de solução MTT (5 mg/mL)..... 22
- Figura 7.** Produção de peróxido de hidrogênio por macrófagos peritoneais de camundongos Swiss (n=8) incubados com diferentes concentrações de ácido fumarprotocetrárico 23
- Figura 8:** Produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais de camundongos Swiss (n=8) incubados com diferentes concentrações de ácido fumarprotocetrárico.. 24
- Figura 9:** (A) Índice fagocitário, (B) média de leveduras fagocitadas, (C) percentual de macrófagos envolvidos na fagocitose (padrões moleculares de patógenos). 26
- Figura 10:** (A) Índice fagocitário, (B) media de leveduras fagocitadas, (C) proporção de macrófagos envolvidos na fagocitose (opsoninas)..... 28
- Figura 11.** Produção de IL-6 por pool de células peritoneais de camundongos Swiss incubados com diferentes concentrações do ácido fumarprotocetrárico.... 29
- Figura 12.** Produção de IL-10 por *pool* de células peritoneais de camundongos Swiss incubados com diferentes concentrações do ácido fumarprotocetrárico.... 30

Figura 13. Produção de IL-12 por *pool* de células peritoneais de camundongos Swiss incubados com diferentes concentrações do ácido fumarprotocetrárico.... 31

Figura 14. Produção de IL-23 por *pool* de células peritoneais de camundongos Swiss incubados com diferentes concentrações do ácido fumarprotocetrárico.... 32

Figura 15. Produção de MCP-1 por *pool* de células peritoneais de camundongos Swiss incubados com diferentes concentrações do ácido fumarprotocetrárico.... 33

Figura 16. Produção de FNT por *pool* de células peritoneais de camundongos Swiss incubados com diferentes concentrações do ácido fumarprotocetrárico.... 34

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CEUA	- Comitê de Ética no Uso de Animais
CO₂	- Dióxido de carbono
DMSO	- Dimetilsulfóxido
ERK MAPK	- Quinases reguladas por sinais extracelulares
FM	- Faculdade de Medicina
FNT	- Fator de necrose tumoral
H₂O₂	- Peróxido de hidrogênio
H₃PO₄	- Ácido fosfórico
IL-6	- Interleucina-6
IL-10	- Interleucina-10
IL-12	- Interleucina-12
IL-23	- Interleucina-23
iNOS	- Óxido nítrico sintase induzida
LPS	- Lipopolissacárideo
MCP-1	- Proteína quimiotática de monócitos
µg	- Micrograma
µL	- Microlitro
µM	- Micromolar
mg	- miligrama
mL	- Mililitro
mM	- Milimolar
MTT	- Metil-tiazol-tetrazólio
NADPH	- Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
NaOH	- Hidróxido de sódio
NFκB	- Fator nuclear Kappa B
ng	- Nanograma
NK	- Natural Killer

nm	- Nanômetro
nM	- Nanomolar
NO	- Óxido nítrico
O₂⁻	- íon superóxido
pg	- picograma
PMA	- Acetato de forbol miristato
RPMI	- Roswell Park Memorial Institute
SDS	- Dodecil sulfato de sódio
SIDA	- Síndrome da imunodeficiência adquirida
SFB	- Soro fetal bovino
STF	- Salina tamponada fosfato
UFMS	- Universidade Federal do Mato Grosso do Sul
UnB	- Universidade de Brasília

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	v
SUMÁRIO.....	vii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	8
2.1 Objetivo geral	9
2.2 Objetivos específicos	9
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	10
3.1 Delineamento experimental.....	11
3.2 Substância líquida.....	12
3.3 Preparação da solução de uso do ácido fumarprotocetrário.....	12
3.4 Animais	13
3.5 Obtenção das células peritoneais	13
3.6 Influência do ácido fumarprotocetrário sobre a viabilidade de células peritoneais.....	13
3.7 Influência do ácido fumarprotocetrário sobre a produção de peróxido de hidrogênio por macrófagos peritoneais de camundongos....	14
3.8 Influência do ácido fumarprotocetrário sobre a produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais de camundongos	15
3.9 Preparação das leveduras para o teste de fagocitose.....	17
3.10 Preparação do <i>pool</i> de soro e sensibilização das leveduras para avaliação da fagocitose facilitada por opsoninas.....	17
3.11 Influência do ácido fumarprotocetrário sobre a capacidade fagocitária de macrófagos peritoneais de camundongos.....	18
3.12 Influência do ácido fumarprotocetrário sobre a produção de citocinas por células peritoneais.....	19
3.13 Métodos estatísticos.....	20
4. RESULTADOS	21
4.1 Efeito do ácido fumarprotocetrário sobre a viabilidade das células peritoneais de camundongos Swiss	22

4.2	Efeito do ácido fumarprotocetrárico sobre a produção de peróxido de hidrogênio por macrófagos peritoneais de camundongos Swiss.....	23
4.3	Efeito do ácido fumarprotocetrárico sobre a produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais de camundongos Swiss	24
4.4	Efeito do ácido fumarprotocetrárico sobre a capacidade fagocitária de macrófagos peritoneais de camundongos Swiss.....	25
4.5	Efeito do ácido fumarprotocetrárico sobre a produção de citocinas por macrófagos peritoneais de camundongos Swiss	29
5.	DISCUSSÃO	35
6.	CONCLUSÕES	41
7.	LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS.....	44
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
	ANEXO I.....	53
	ANEXO II.....	55
	ANEXO III.....	58

1. INTRODUÇÃO

De acordo com dados publicados em 2012 pela Organização Mundial de Saúde, doenças infecciosas, incluindo as parasitárias, foram responsáveis pela morte de mais de 8,7 milhões de pessoas em todo o mundo no ano de 2008 (WHO 2012a). As mortes causadas por infecções respiratórias, diarreias, sarampo, Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), malária e tuberculose correspondem a 85% da mortalidade por infecção em todo o planeta e a resistência aos medicamentos contra essas doenças é crescente (WHO 2012b).

O uso abusivo de antibióticos na medicina humana e na criação de animais, ao longo dos últimos 70 anos, levou a um aumento do número e tipos de microrganismos resistentes a esses medicamentos (WHO 2012c). Um número crescente de isolados bacterianos é resistente a praticamente todos os agentes terapêuticos disponíveis. Resistência a múltiplas drogas tem sido demonstrada em *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* sorotipo *Typhimurium*, *Shigella dysenteriae*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Xanthomonas* e *Burkholderia* (Giedraitiene et al. 2011).

O uso de antimicrobianos tem produzido grandes avanços na saúde pública, entre eles o declínio na morbidade e mortalidade, porém todo esse progresso está seriamente ameaçado pelo aumento constante na resistência a essas drogas, que geram, além de aumento da mortalidade, elevação nos custos de tratamento e disseminação de doenças (Roses Periago 2011).

Nos últimos anos, o desenvolvimento de novas drogas antimicrobianas tem diminuído consideravelmente (Cornaglia et al. 2004). Como consequência da falta de novas drogas, mais microrganismos resistentes aos antimicrobianos podem emergir e infecções comuns podem se tornar intratáveis ou até mesmo letais. Essa ameaça é mais óbvia no que diz respeito às infecções bacterianas, às infecções parasitárias e às infecções associadas à SIDA (Norrby et al. 2005).

A Indústria farmacêutica tem se concentrado na pesquisa e desenvolvimento de novos análogos de drogas já conhecidas, no entanto, a

resistência cruzada já é aparente ou antecipada contra cada um dos novos análogos atualmente em processo de desenvolvimento. Em geral, estas estratégias de modificação se tornarão menos e menos produtivas (Theuretzbacher 2011). A solução para esse problema pode ser o desenvolvimento de novas moléculas que não sejam afetadas pelos mecanismos de resistência aos antimicrobianos (Bax et al. 2000).

Existe uma grande variedade de produtos naturais disponíveis para pesquisa, pois ocorreram grandes avanços na tecnologia disponível para purificação e identificação dessas substâncias (Harvey 2007). Novas moléculas obtidas a partir de produtos naturais podem ser fonte para o desenvolvimento de novos antimicrobianos (Leeds et al. 2006).

Os compostos extraídos de líquens são uma promissora fonte para pesquisa e desenvolvimento de novos medicamentos. Os extratos liquênicos têm sido utilizados com propósitos terapêuticos, na medicina popular, há centenas de anos (Rankovic et al. 2011). Muitas espécies de *Cladonia* foram usadas no passado para tratamento de tuberculose; espécies de *Usnea* são atualmente usadas na Ásia, África e Europa para alívio da dor e controle da febre; a *Usnea longíssima* é utilizada na China para o tratamento de feridas e como expectorante; a *Ramalina thrauta* foi usada na Finlândia para o tratamento de feridas, micoses, dores de garganta e de dente (Ingolfssdottir 2002). A *Cetraria islandica* é utilizada na Europa para tratamento de tosse seca, irritação do trato respiratório, laringite, gastrite e complicações gástricas (Freysdottir et al. 2008). A *Peltigera canina* é utilizada na Índia contra males do fígado (Elix 1996).

Metabólitos extraídos de líquens exercem ações antibacteriana, antifúngica, antiviral, anti-inflamatória, antipirética, analgésica, antitumoral e imunomoduladora. Mesmo sendo estas múltiplas atividades dos metabolitos de líquens já reconhecidas, o seu potencial terapêutico não foi ainda completamente explorado (Muller 2001).

Os líquens possuem ampla distribuição e habitam as mais diferentes regiões do planeta. Eles são geralmente de crescimento em superfícies de

rochas, no solo não fértil, bem como epífitas nos troncos e folhas de árvores (Rankovic 2011). São capazes de sobreviver em situações de estresse ecológico por meio de dessecação e interrupção da fotossíntese não sofrendo assim com alta iluminação, altas temperaturas e com a escassez de água (Kosugi et al. 2009). São organismos simbióticos, normalmente compostos por um fungo (micobionte) e um ou mais componentes fotossintéticos (fotobionte) que pode ser uma alga verde ou cianobactéria (Van Haluwyn 1999).

Estima-se que existam aproximadamente 13.500 espécies de fungos liquenizados, o que corresponde a 20% dos fungos conhecidos. Os ascomicetos correspondem a 98% dos fungos liquênicos e o restante são deuteromicetos e basidiomicetos. As algas mais comuns encontradas na associação são as clorofíceas, mas ocorre também com cianofíceas (Honda & Vilegas 1998). O talo liquênico (Figura 1) é constituído em sua maior parte por hifas do fungo e, em menor proporção, por filamentos da alga, apresentando uma forma definida que pode ser crostosa (o talo é semelhante a uma crosta e encontra-se fortemente aderido ao substrato), foliosa (o talo é parecido com folhas) ou fruticosa (o talo é parecido com um arbusto e tem posição ereta) (Ahmadjian 1965; Culbertson 1985).

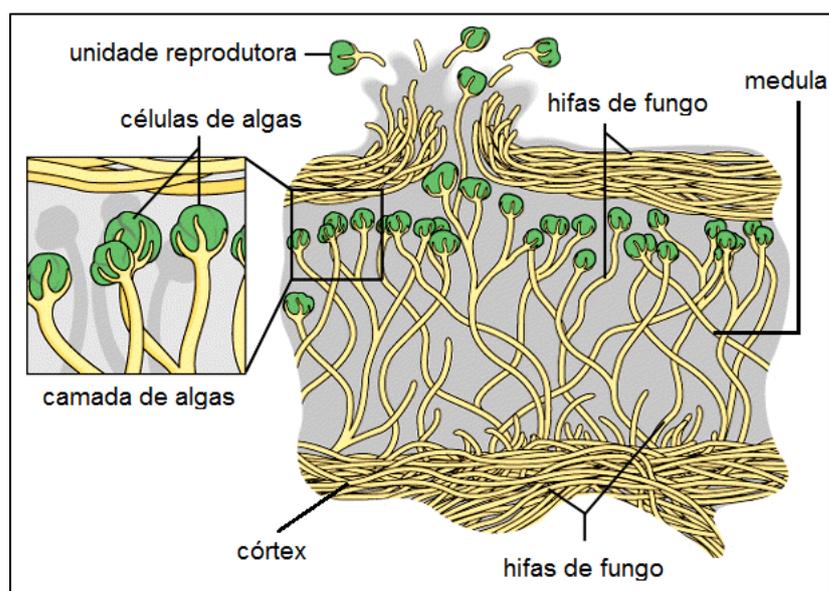


Figura 1: Microestrutura do talo liquênico.

Fonte: Adaptada de <http://www.southtexascollege.edu>.

Os líquens podem se reproduzir como resultado de reprodução sexuada dos fungos presentes na simbiose. Quando os esporos formados pelos fungos do líquen se soltam e germinam, as hifas resultantes, que encontram clorofíceas ou cianobactérias em sua proximidade, crescem através das células das algas e um novo líquen se desenvolve. Eles também podem se reproduzir assexuadamente, por sorédios (propágulos que contém células de algas e hifas do fungo), por isídios (projeções do talo, parecido com verrugas) e por fragmentação do talo (Honegger & Scherrer 1996).

Quanto à produção de substâncias, os líquens sintetizam metabólitos primários (intracelulares) e secundários (extracelulares). Os metabólitos primários são proteínas, aminoácidos, carboidratos, carotenoides, polissacarídeos e vitaminas que estão ligados na parede celular e no protoplasto (Fahselt 1994). Já os metabólitos secundários são constituídos por uma grande variedade de compostos alifáticos e aromáticos, principalmente ácidos fenólicos fracos, encontrados no córtex ou medula do talo liquênico. Atualmente são conhecidos aproximadamente 700 compostos provenientes do metabolismo secundário de líquens (Elix 1996) e dentre esses está o ácido fumarprotocetrárico, uma depsidona produzida pelo líquen *Cladonia verticillaris* (Honda 1998) (Figura 2).



Figura 2: Talo do líquen *Cladonia verticillaris*.

Fonte: <http://matisse.chem.uniroma.it/apol>

As depsídonas são ácidos fenólicos derivados da via biossintética do acetil polimalonil (Figura 3). Os compostos derivados da via do acetil polimalonil são produtos aromáticos que têm como principal característica a união de duas ou três unidades fenólicas do tipo orcinol ou β -orcinol por meio de ligações éter, éster e carbono-carbono. A grande maioria dos depsídeos, depsídonas, dibenzofuranos, ácidos úsnico e depsonas parecem ser produzidas por essa via e todas essas substâncias são peculiares dos líquens (Elix 1996).

O ácido fumarprotocetrárico é um ácido fenólico que pode ser originado por inserção do ácido fumárico na posição 3 do ácido orselínico (na forma de ácido 3-metil-orselínico) dando origem ao anel β do ácido fumarprotocetrárico, ou por esterificação direta do grupo $-\text{CH}_2\text{OH}$ do anel β do ácido protocetrárico com o ácido fumárico. Apresenta-se em forma de cristais, tem ponto de fusão entre 250-260°C e massa molecular de 472,37 (Yasuhiko Asahina 1954).

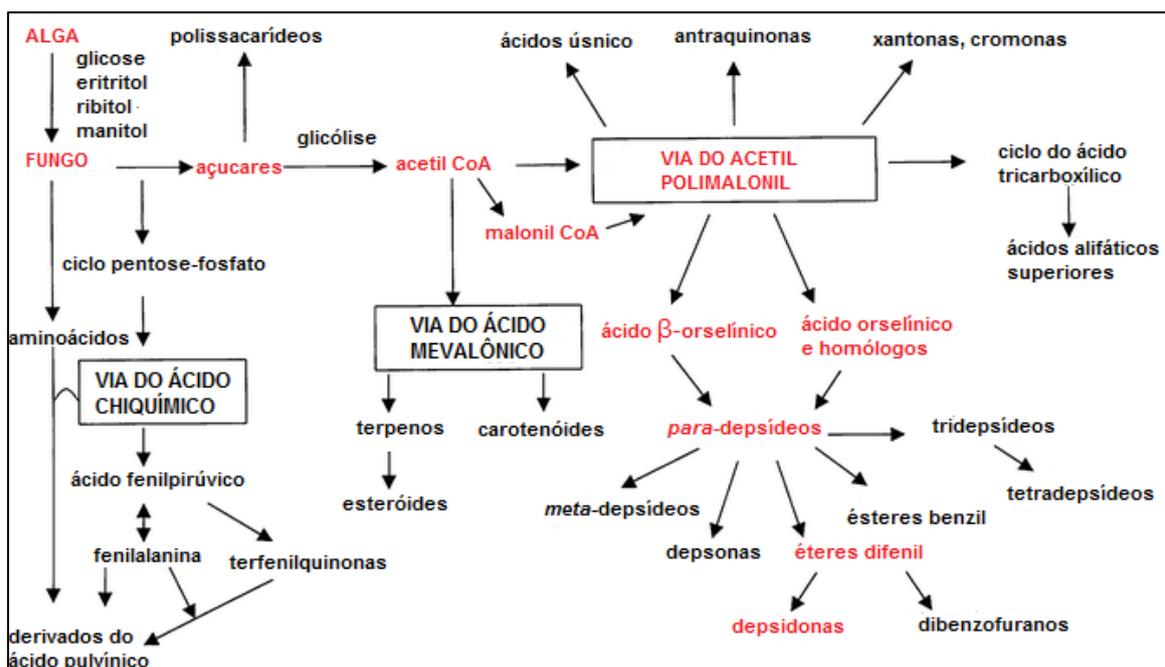


Figura 3: Prováveis vias de produção da maior parte dos metabólitos de líquens.

Fonte: Elix, 1996.

Os ácidos fenólicos têm sido descritos como possuidores de atividade antibacteriana e antifúngica (Cueva et al. 2010). O estudo realizado por Kosanic & Rankovic, em 2011, mostrou que o ácido fumarprotocetrárico apresenta forte ação antimicrobiana contra *Bacillus mycoides*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Botrytis cinerea*, *Candida albicans*, *Fusarium oxysporum*, *Mucor mucedo*, *Paecilomyces variotii*, *Penicillium verrucosum* e *Trichoderma harzianum* (Kosanic & Rankovic 2011). Esses resultados são similares aos reportados por Yilmaz, que, em 2004, encontrou atividade desse ácido contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Proteus vulgaris*, *Aeromonas hydrophila*, *Streptococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Candida albicans* e *Candida glabrata* (Yilmaz et al. 2004).

Considerando que o conhecimento do efeito das drogas sobre a funcionalidade das células é de essencial importância no processo de desenvolvimento de novos medicamentos e que são escassos os conhecimentos sobre o mecanismo de ação do ácido fumarprotocetrárico sobre processos celulares, nosso trabalho teve como objetivo avaliar o efeito dessa substância sobre células peritoneais de camundongos visando a futuras aplicações biomédicas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do ácido fumarprotocetrárico sobre a viabilidade e a função de macrófagos peritoneais de camundongos da linhagem Swiss em ensaios *in vitro*.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a viabilidade de células peritoneais incubadas com diferentes concentrações do ácido fumarprotocetrárico;
- Avaliar a produção de peróxido de hidrogênio e de óxido nítrico por macrófagos peritoneais incubados com diferentes concentrações de ácido fumarprotocetrárico;
- Avaliar a capacidade fagocitária de macrófagos peritoneais incubados com diferentes concentrações do ácido fumarprotocetrárico e na presença de leveduras sensibilizadas ou não com soro fresco dos animais;
- Avaliar a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias por macrófagos peritoneais incubados com diferentes concentrações de ácido fumarprotocetrárico

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Delineamento experimental

Neste estudo foram avaliados os efeitos do ácido fumarprotocetrárico, *in vitro*, sobre células peritoneais de camundongo Swiss. Avaliou-se a viabilidade das células quando expostas a diferentes concentrações do ácido e a influência deste sobre a fagocitose, a produção de peróxido de hidrogênio, a produção de óxido nítrico e a produção de citocinas (Figura 4).

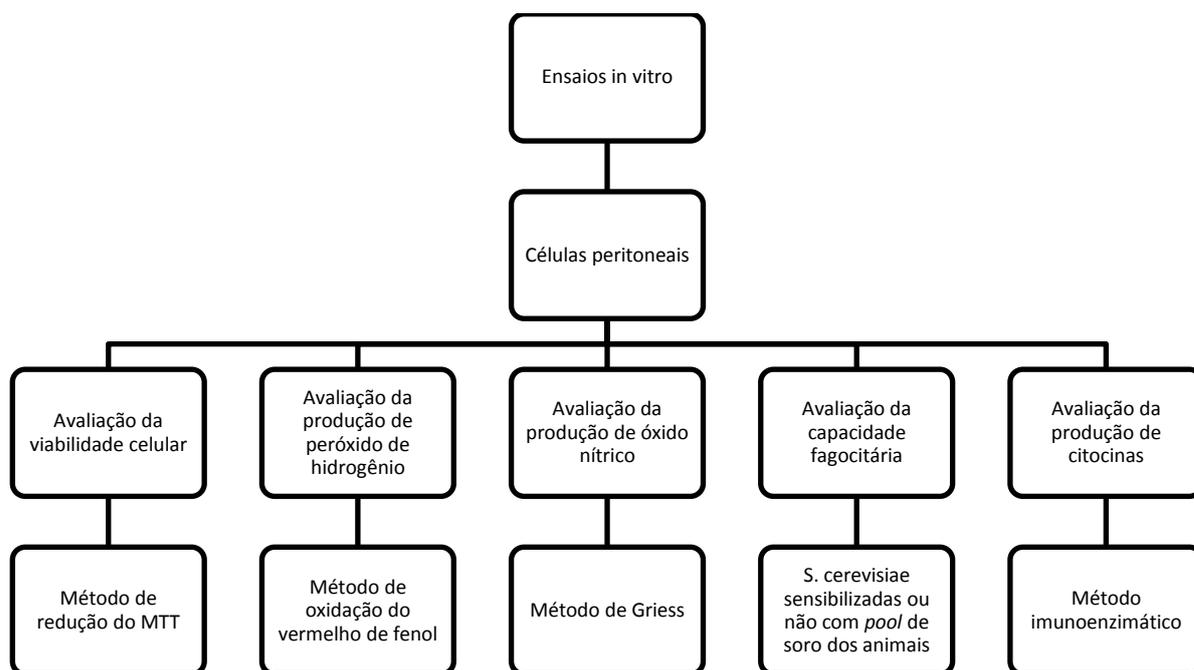


Figura 4. Fluxograma dos ensaios in vitro

3.2 Substância liquênica

O ácido fumarprotocetrárico foi extraído e fornecido pelo Departamento de Química da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS). É derivado do líquen *Cladonia verticillaris* e tem como estrutura química:

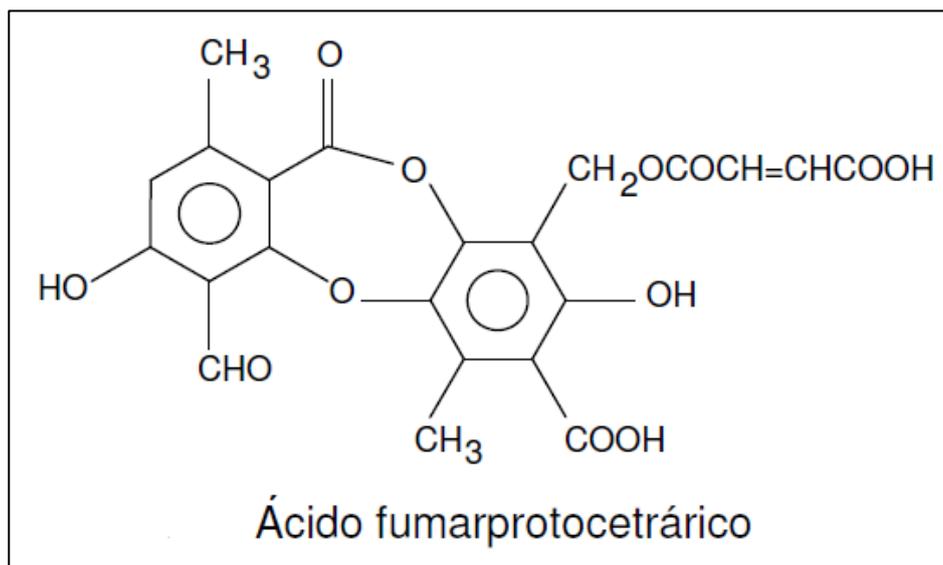


Figura 5. Estrutura química do ácido fumarprotocetrárico.

Fonte: Honda, 1998

3.3 Preparação da solução de uso do ácido fumarprotocetrárico

O ácido fumarprotocetrárico foi pesado e diluído em Dimetil Sulfóxido (DMSO), obtendo-se uma solução estoque com uma concentração de 8 mg/mL. As soluções de uso (10, 50 ou 100 µg/mL) foram preparadas com o meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640, pH 7,2, com 10% de soro fetal bovino (SFB) com uma concentração final de 1,25% de DMSO.

3.4 Animais

Os animais utilizados nos ensaios foram camundongos machos e fêmeas da linhagem Swiss, não isogênicos, pesando de 20 a 30 g, provenientes do alojamento de animais da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (FM-UnB), mantidos sob temperatura ambiente, ciclo claro/escuro de 12 horas, alimentados com ração balanceada e recebendo água potável *ad libitum*.

As normas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal foram rigorosamente adotadas, tanto para a experimentação quanto para a manutenção dos animais. O projeto de pesquisa desenvolvido nesse estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-FM) da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília em 25 de abril de 2012.

3.5 Obtenção das células peritoneais

As células foram obtidas de camundongos previamente submetidos à eutanásia por inalação de dióxido de carbono (CO₂). Foram coletadas por meio da injeção intraperitoneal de 10 mL de salina tamponada com fosfato (STF), pH 7,2, 4°C e centrifugadas a 200 x g por 10 minutos, em uma centrífuga resfriada a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspendido com 1 mL de meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) acrescido ou não com soro fetal bovino 10% e, em seguida, as células foram quantificadas em hematocítômetro. As suspensões de células foram mantidas sob refrigeração em tubos plásticos graduados de 15 mL (LabTech, Melbourn, Inglaterra), desde a sua coleta até o início dos experimentos.

3.6 Influência do ácido fumarprotocetrárico sobre a viabilidade de células peritoneais

A influência do ácido fumarprotocetrárico sobre a viabilidade de células peritoneais foi determinada pela incubação de diferentes concentrações do ácido

(10, 50 ou 100 $\mu\text{g/mL}$) com as células (2×10^5). O método utilizado para essa avaliação baseia-se na redução do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) pela enzima succinato desidrogenase presente na membrana mitocondrial, resultando na formação de cristais de formazan, cuja produção é proporcional ao número de células metabolicamente ativas (Mosmann 1983).

Os ensaios foram realizados individualmente com células coletadas de oito camundongos, em duplicatas, utilizando placas de microcultivo de fundo plano com 96 escavações (LabTech, Melbourn, Inglaterra). As células peritoneais (2×10^5 /escavação) foram incubadas por 1h, a 37°C , em atmosfera de 5% de CO_2 , em meio RPMI 1640, acrescido com 10% de soro fetal bovino, na presença ou não das diferentes concentrações do ácido fumarprotocetrárico, num volume final de 200 μL . Em seguida, adicionou-se a cada escavação 10 μL da solução de MTT (5 mg/mL) e então as células foram incubadas, nas mesmas condições anteriores, por mais 4h. Para a liberação dos cristais de formazan, foram adicionados 50 μL de solução de dodecil sulfato de sódio (10%) em cada escavação e as leituras das absorbâncias foram feitas em espectrofotômetro com filtro de 570 nm (SpectraMax® Plus 384 Molecular Devices, Sunnyvale, USA).

Os resultados foram expressos em percentual de redução do MTT pelas células peritoneais, tendo como parâmetro o grupo controle, para o qual foi atribuído 100% de redução.

3.7 Influência do ácido fumarprotocetrárico sobre a produção de peróxido de hidrogênio por macrófagos peritoneais de camundongos

Com o objetivo de investigar a influência do ácido fumarprotocetrárico sobre a produção de H_2O_2 por macrófagos peritoneais, diferentes concentrações dessa substância (10, 50 ou 100 $\mu\text{g/mL}$) foram utilizadas. A avaliação da concentração de H_2O_2 foi feita, individualmente, em cultivos de células peritoneais coletadas de oito camundongos, pela técnica de oxidação de vermelho de fenol

em presença de peroxidase (Pick & Keisari 1980). Essa técnica baseia-se na oxidação da fenolsulftaleína (vermelho de fenol) pela peroxidase na presença de H_2O_2 , que dá origem a um produto que pode ser lido por espectrofotometria.

O experimento foi realizado em triplicata, em placa de microcultivo de fundo plano com 96 escavações (LabTech, Melbourn, Inglaterra). As células peritoneais (2×10^5 /escavação) foram incubadas em 200 μ L de meio RPMI 1640, pH 7,2, a 4°C, sem soro fetal bovino, em câmara úmida a 37°C, com 5% de CO_2 em ar, por 2h, para a aderência das células. Após a incubação, as escavações foram lavadas três vezes com STF (0,15 M, pH 7,2), a 37°C e então os macrófagos foram incubados por 60min, nas mesmas condições anteriormente descritas, em 140 μ L de solução de vermelho de fenol com 19 unidades de peroxidase tipo I RZ 1.0 (Sigma-Aldrich, St Louis, USA), na presença ou não de acetato de forbol miristato (PMA) (20 nM/mL) ou das diferentes concentrações do ácido fumarprotocetrárico (10, 50 ou 100 μ g/mL). A reação foi interrompida com 10 μ L de hidróxido de sódio (NaOH) 1N.

Uma curva-padrão de peróxido de hidrogênio (Sigma-Aldrich, St Louis, USA), em vermelho de fenol, acrescido de peroxidase, foi preparada para as concentrações finais de 0; 1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50 ou 100 μ M; essa curva foi distribuída em triplicata na placa, logo após a última incubação e anteriormente ao acréscimo de NaOH 1N. As leituras das absorbâncias foram feitas em espectrofotômetro com filtro de 610nm (SpectraMax® Plus 384 Molecular Devices, Sunnyvale, USA) e os resultados foram expressos em micromoles (μ M) de H_2O_2 .

3.8 Influência do ácido fumarprotocetrárico sobre a produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais de camundongos

Para investigar a influência do ácido fumarprotocetrárico sobre a produção de óxido nítrico, utilizou-se o método de Griess (Green et al. 1982), que se baseia na reação do nitrito com uma amina primária aromática, em meio ácido, para

formar um sal de diazônio que, por sua vez, reage com um composto aromático formando um azo-composto de coloração violeta, que pode ser quantificado por espectrofotometria.

O ensaio foi realizado em triplicata, em placa de microcultivo de fundo plano com 96 escavações (LabTech, Melbourn, Inglaterra). As células peritoneais (2×10^5 /escavação) foram incubadas em 200 μ L de meio RPMI 1640, pH 7,2, a 4°C, sem soro fetal bovino, em câmara úmida, a 37°C, com 5% de CO₂ em ar, por 2h para a aderência das células. Após a incubação, as escavações foram lavadas por três vezes com STF (0,15 M, pH 7,2) a 37°C para remover as células não aderidas e, em seguida, os macrófagos foram incubados nas mesmas condições anteriores, por 24h, em meio RPMI, acrescido com 10% de soro fetal bovino, e na presença ou não de diferentes concentrações do ácido fumarprotocetrárico (10, 50 ou 100 μ g/mL). Uma solução de 20 ng/mL de lipopolissacarídeo (LPS *Escherichia coli*, sorotipo 055:b5, Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) foi utilizada como controle positivo. Decorrido o tempo de incubação, a placa foi centrifugada a 200 x g por 10 min e em seguida, transferiu-se 100 μ L do sobrenadante de cada escavação para outra placa e, então, acrescentou-se 100 μ L de reagente de Griess (1-N naftiletileno diamina dihidroclorido a 0,1%, sulfanilamida a 1% e ácido fosfórico (H₃PO₄) a 1,25%).

Uma curva-padrão com nitrito de sódio (NaNO₂), em água destilada, foi preparada nas concentrações 0; 1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50 ou 100 μ M; essas foram distribuídas, em triplicata, logo após a última incubação e anteriormente ao acréscimo do reagente de Griess. As leituras de absorbâncias foram feitas, imediatamente, em espectrofotômetro com filtro de 540 nm (SpectraMax® Plus 384 Molecular Devices, Sunnyvale, USA). Os resultados foram expressos em micromoles (μ M) de nitrito.

3.9 Preparação das leveduras para o teste de fagocitose

A suspensão estoque de leveduras, *Saccharomyces cerevisiae*, foi obtida por meio da dissolução de 50g de fermento fresco (Fleischman) em 220 mL de STF, pH 7,2. Esta suspensão foi autoclavada por 30 minutos a uma temperatura de 120°C e posteriormente lavada com STF até a obtenção de um sobrenadante límpido. O sedimento foi resuspenso em 28 mL de STF contendo 0,1 M de 2-mercaptoetanol e incubado por 2 horas a 37°C. Na sequência, a suspensão foi lavada três vezes com STF e o sedimento, resuspenso em 55 mL de solução de STF com iodoacetoamida a 0,02 M. Após incubação por 2 horas em temperatura ambiente, a suspensão foi lavada três vezes com STF, o sedimento resuspenso em 220 mL de STF e submetida a autoclavagem por 30 minutos a 120°C. Depois de lavado até a obtenção de um sobrenadante límpido, o sedimento foi resuspenso em 10 mL de tampão veronal, pH 7,2, contendo azida sódica (2 g/L) como preservativo.

A suspensão de uso foi obtida a partir de 40 µL da solução estoque que, depois de lavado 3 vezes com 960 µL de STF, foi resuspenso com 1000 µL de STF e quantificada em hematocítômetro por microscopia óptica (Lachmann et al. 1978).

3.10 Preparação do *pool* de soro e sensibilização das leveduras para avaliação da fagocitose facilitada por opsoninas

Para a sensibilização das leveduras que foram utilizadas no ensaio da fagocitose por receptores para opsoninas, foi utilizado *pool* de soro fresco de camundongos. Depois de coletado, o sangue dos animais foi submetido à centrifugação (200 x g) e o sobrenadante, coletado. A sensibilização das leveduras foi feita por sua incubação por 30 minutos, em banho-maria, a 37°C, com meio RPMI acrescido com 10% do *pool* de soro.

3.11 Influência do ácido fumarprotocetrárico sobre a capacidade fagocitária de macrófagos peritoneais de camundongos

Para avaliar o efeito de diferentes concentrações do ácido fumarprotocetrárico sobre a fagocitose, células peritoneais de camundongos (preponderantemente macrófagos e linfócitos) foram coletadas. Os experimentos foram feitos individualmente em cultivos de células peritoneais de oito animais. Os testes foram feitos em duplicata, em placas de 24 escavações, estéreis (TPP – Zellkultur Testplate – Suíça), contendo lamínulas de vidro de 13 mm de diâmetro para a aderência. As células peritoneais (2×10^5 células/400 μL de meio RPMI 1640 sem soro) foram distribuídas nas escavações, incubadas em câmara úmida a 37°C , por 120min, com 5% de CO_2 em ar. Após a incubação, as escavações foram lavadas por três vezes com STF (0,15 M, pH 7,2) para a retirada das células não aderidas. Na sequência, 400 μL de suspensão contendo leveduras (1×10^6 leveduras/400 μL), sensibilizadas ou não, foram distribuídos em cada escavação, na presença de diferentes concentrações do ácido fumarprotocetrárico (0, 10, 50 ou 100 $\mu\text{g/mL}$) e então, os macrófagos foram novamente incubados por 30min nas mesmas condições descritas. Decorrido o período de incubação, as escavações foram lavadas com STF para a retirada das leveduras não fagocitadas e, então, as lamínulas foram secas, fixadas com metanol absoluto e coradas por 10 minutos com solução de Giensa a 10% em tampão para coloração, pH 7,2. Depois de lavadas e secas ao ar, as lamínulas foram montadas em lâminas para microscopia com Entellan (Merk, Alemanha) e a fagocitose avaliada por microscopia óptica.

A análise da fagocitose foi feita considerando-se o índice fagocitário, que foi calculado pela multiplicação do número de macrófagos envolvidos na fagocitose pela média de leveduras fagocitadas. Para esse cálculo foram analisados 200 macrófagos, de cada lamínula, ao microscópio óptico (1000x) (Muniz-Junqueira et al. 2003).

3.12 Influência do ácido fumarprotocetrárico sobre a produção de citocinas por células peritoneais

Para avaliar o efeito de diferentes concentrações do ácido fumarprotocetrárico sobre a produção de citocinas, foram coletadas células peritoneais de 9 camundongos; nesse ensaio foram utilizadas *pool* de células obtidas de 3 animais, que depois de quantificadas foram distribuídas em triplicata, em placas de 24 escavações (TPP – Zellkultur Testplate – Suíça). Para obtenção do sobrenadante, as células peritoneais (1×10^6 células/900 μ L em RPMI 1640 com 10% de soro fetal bovino) foram incubadas por 4h, a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂, na presença ou não de LPS (500 ng/mL), 1,25% de DMSO e das diferentes concentrações do ácido fumarprotocetrárico (10, 50 ou 100 μ g/mL). Ao final desse período, o sobrenadante foi recuperado e reservado para avaliação da produção de citocinas.

Os níveis das citocinas Interleucina-6 (IL-6), Interleucina-10 (IL-10), Interleucina-12 (IL-12), Interleucina-23 (IL-23), proteína quimiotática de monócitos (MCP-1) e Fator de Necrose Tumoral (FTN) foram analisados nos sobrenadantes das culturas por meio do ensaio imunoenzimático (ELISA – Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay), conforme as instruções do fabricante (eBioscience).

As placas de 96 escavações foram previamente revestidas com anticorpo de captura durante 24 horas a 4°C e então, foram lavadas 5 vezes com tampão fosfato contendo Tween 20 (Sigma) a 0,05% e incubadas por 1h com solução de STF-SFB 1%, à temperatura ambiente. Posteriormente, 50 μ L dos sobrenadantes das culturas e o mesmo volume das citocinas recombinantes da curva-padrão (1ng/mL, 500, 250, 125, 63, 31 e 16 pg/mL) foram adicionadas às escavações e então, incubadas durante 24h a 4°C. Após este período, as placas foram lavadas 5 vezes com tampão fosfato contendo Tween 20 (Sigma) a 0,05% e os anticorpos de detecção anti IL-6, IL-10, IL-12, IL-23, MCP-1 e FNT foram adicionados e incubados durante 1h à temperatura ambiente. Depois de lavadas 3 vezes com

tampão fosfato contendo Tween 20 (Sigma) a 0,05%, foram adicionados 50 μ L de estreptavidina e as placas foram incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente. As placas foram então lavadas 5 vezes com tampão fosfato contendo Tween 20 (Sigma) a 0,05% e incubadas com 50 μ L do substrato TMB (solução de tetrametilbenzidina 36 mM em dimetilsulfóxido 100%, diluída em tampão citrato 40 mM e peróxido de hidrogênio 1,27 mM, pH 4,3.) por 15 minutos. Em seguida, foram adicionados 25 μ L de solução de ácido sulfúrico 1M para a parada da reação e as placas foram lidas em leitora de placas a 450 nm. Os dados foram analisados com o programa Soft Max Pro, e a dosagem baseada na respectiva curva-padrão. Os resultados foram expressos em pg/mL.

3.13 Métodos estatísticos

A normalidade das variáveis foi analisada empregando-se o teste de Kolmogorov-Smirnov e, a homogeneidade das variâncias, empregando-se o teste de Bartlett. Para comparações entre dois grupos com distribuição normal foi usado o teste t-pareado e, para os grupos não normais, o teste de Wilcoxon. As análises foram feitas empregando-se o programa Prism[®] 5 Software Package (GraphPad, USA, 2005). Diferenças de $p < 0,05$ foram consideradas significantes.

4. RESULTADOS

4.1 Efeito do ácido fumarprotocetrário sobre a viabilidade das células peritoneais de camundongos Swiss

Os resultados do ensaio da viabilidade celular medida pelo método da redução do MTT, na matriz mitocondrial, mostraram que as diferentes concentrações do ácido fumarprotocetrário causaram aumento significativo no percentual de formação dos cristais de formazan, pelas células peritoneais, na comparação com o controle DMSO (101,3%), sendo de 112,3% com 10 $\mu\text{g/mL}$ (Wilcoxon, $p=0,008$), de 134,8% com 50 $\mu\text{g/mL}$ (Wilcoxon, $p=0,008$) ou de 124,9% com 100 $\mu\text{g/mL}$ (Wilcoxon, $p=0,05$).

A utilização do DMSO, como diluente da droga, não afetou o metabolismo celular na comparação com o controle RPMI (Wilcoxon, $p=0,148$) (Figura 6).

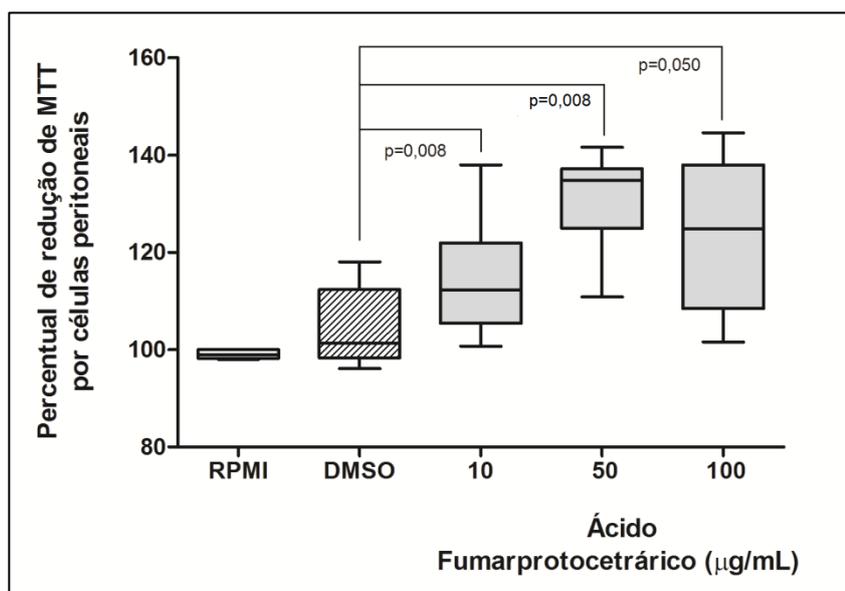


Figura 6: Efeito das diferentes concentrações do ácido fumarprotocetrário sobre células peritoneais de camundongos Swiss ($n=8$), após incubação por 4 horas, na presença de 10 μL de solução MTT (5 mg/mL). Os resultados mostraram que as concentrações 10, 50 ou 100 $\mu\text{g/mL}$ da droga aumentaram o percentual de formação dos cristais de formazan, pelas células peritoneais, na comparação com o controle DMSO. A utilização do DMSO 1,25%, como diluente, não afetou o metabolismo celular quando comparado ao controle RPMI. Estão representados as medianas, os quartis, os valores máximos e mínimos e os pontos extremos.

4.2 Efeito do ácido fumarprotocetrário sobre a produção de peróxido de hidrogênio por macrófagos peritoneais de camundongos Swiss

O ácido fumarprotocetrário nas concentrações de 50 ou 100 $\mu\text{g/mL}$ aumentou a produção de peróxido de hidrogênio. A mediana da produção de H_2O_2 subiu de 2,0 μM , no controle DMSO, para 4,7 μM com 50 $\mu\text{g/mL}$ (teste t pareado, $p=0,005$) ou para 21,4 μM com 100 $\mu\text{g/mL}$ (teste t pareado, $p<0,0001$). O tratamento com 10 $\mu\text{g/mL}$ da droga diminuiu esta produção para 0,7 μM no grupo tratado (Wilcoxon, $p=0,016$).

Os resultados mostraram que a produção de H_2O_2 obtida para o controle DMSO (2,0 μM) não diferiu da produção obtida para o controle RPMI (0,7 μM) (Wilcoxon, $p=0,078$). O estímulo com o PMA aumentou a mediana da produção de 0,7 μM (no controle RPMI) para 2,3 μM (teste t pareado, $p=0,033$) (Figura 7).

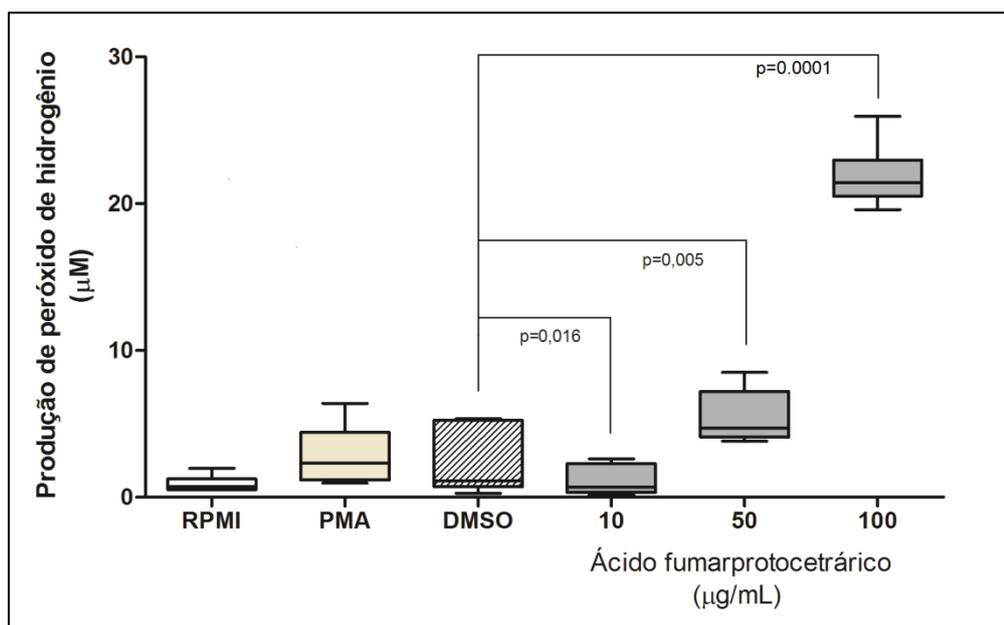


Figura 7. Produção de peróxido de hidrogênio por macrófagos peritoneais de camundongos Swiss ($n=8$) incubados com diferentes concentrações de ácido fumarprotocetrário (10, 50 ou 100 $\mu\text{g/mL}$). Os resultados mostraram que houve aumento na produção de H_2O_2 nas concentrações de 50 ou 100 $\mu\text{g/mL}$ e diminuição da produção na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$. Em relação ao controle RPMI, a utilização do DMSO 1,25% não afetou a produção de peróxido de hidrogênio. Estão representados as medianas, os quartis, os valores máximos e mínimos e os pontos extremos.

4.3 Efeito do ácido fumarprotocetrário sobre a produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais de camundongos Swiss

A produção de óxido nítrico obtida para as diferentes concentrações do ácido fumarprotocetrário, de $8,2 \pm 3,1 \mu\text{M}$ para $10 \mu\text{g/mL}$, de $8,9 \pm 3,6 \mu\text{M}$ para $50 \mu\text{g/mL}$ ou de $12,2 \pm 7,2 \mu\text{M}$ para $100 \mu\text{g/mL}$, não diferiu da produção obtida para o controle DMSO ($7,5 \pm 1,9 \mu\text{M}$) (teste t pareado, $p > 0,05$).

A produção de óxido nítrico obtida para o controle DMSO ($7,5 \pm 1,9 \mu\text{M}$) foi menor do que a do controle RPMI ($16,6 \pm 5,6 \mu\text{M}$) (teste t pareado, $p < 0,001$); já o estímulo com 20 ng/mL de LPS aumentou em 56% a produção de NO em relação ao controle RPMI ($16,6 \pm 5,6 \mu\text{M}$) (teste t pareado, $p = 0,006$) (Figura 8).

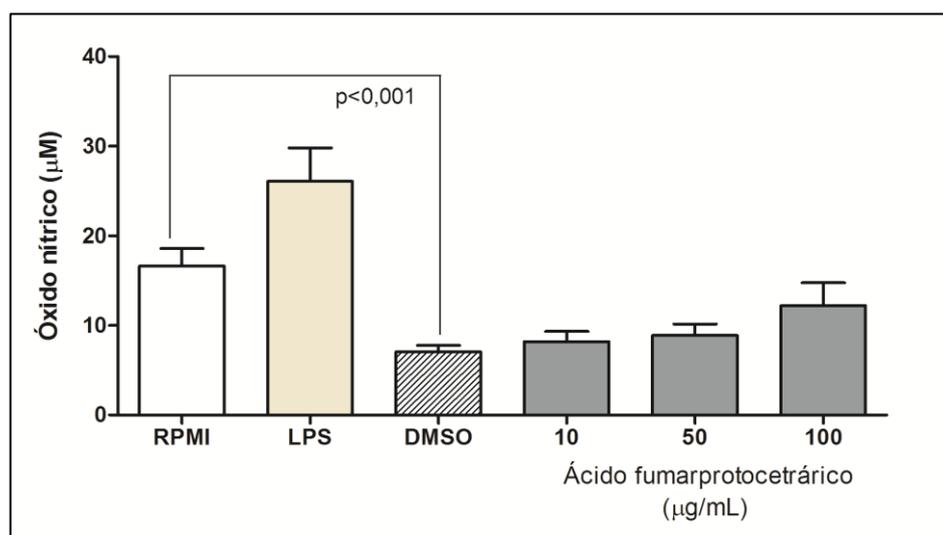


Figura 8: Produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais de camundongos Swiss ($n=8$) incubados com diferentes concentrações de ácido fumarprotocetrário ($10, 50$ ou $100 \mu\text{g/mL}$). Os resultados mostraram que o ácido fumarprotocetrário não afetou a produção de óxido nítrico em relação ao grupo controle DMSO. A utilização do DMSO 1,25%, como diluente, diminuiu a produção de NO, na comparação com o controle RPMI. Estão representados as médias e os desvios padrão.

4.4 Efeito do ácido fumarprotocetrárico sobre a capacidade fagocitária de macrófagos peritoneais de camundongos Swiss

O estudo da capacidade fagocitária, utilizando-se *Saccharomyces cerevisiae*, quando não sensibilizadas, permitiu avaliar a fagocitose por receptores para os padrões moleculares de patógenos e, quando sensibilizadas com o *pool* de soro dos próprios camundongos, permitiu avaliar os receptores para o complemento e porção Fc de imunoglobulinas (IgG).

A. Fagocitose por receptores para padrões moleculares de patógenos

O tratamento com diferentes concentrações do ácido fumarprotocetrárico 10, 50 ou 100 µg/mL interferiu na fagocitose de *Saccharomyces cerevisiae* por macrófagos peritoneais de camundongos Swiss quando essa ocorreu por receptores para os padrões moleculares de patógenos.

O índice fagocitário subiu de 54,7, no controle DMSO, para 95,2 com 10 µg/mL (teste t pareado, $p=0,016$), para 104,7 com 50 µg/mL (teste t pareado, $p=0,005$) ou para 77,4 com 100 µg/mL (teste t pareado, $p<0,0001$). O diluente DMSO 1,25% reduziu a capacidade fagocitária dos macrófagos para 54,7 na comparação com o controle RPMI (75,7) (teste t pareado, $p=0,033$) (Figura 9A).

A média de leveduras fagocitadas não foi afetada pelas diferentes concentrações do ácido fumarprotocetrárico (teste t pareado, $p>0,05$), assim como pelo diluente DMSO (teste t pareado, $p>0,05$) (Figura 9B).

O percentual de macrófagos envolvidos na fagocitose, analisado pelo teste t pareado, aumentou, na comparação com o controle DMSO (29,7%), para 42,4% com 10 µg/mL ($p=0,009$), para 46,1% com 50 µg/mL ($p=0,005$) ou para 41,4% com 100 µg/mL ($p<0,001$). O diluente DMSO 1,25% reduziu o percentual de macrófagos envolvidos na fagocitose para 29,7% na comparação com o controle RPMI que foi de 39,7% ($p=0,022$) (Figura 9C).

FAGOCITOSE POR PADRÕES MOLECULARES DE PATÓGENOS

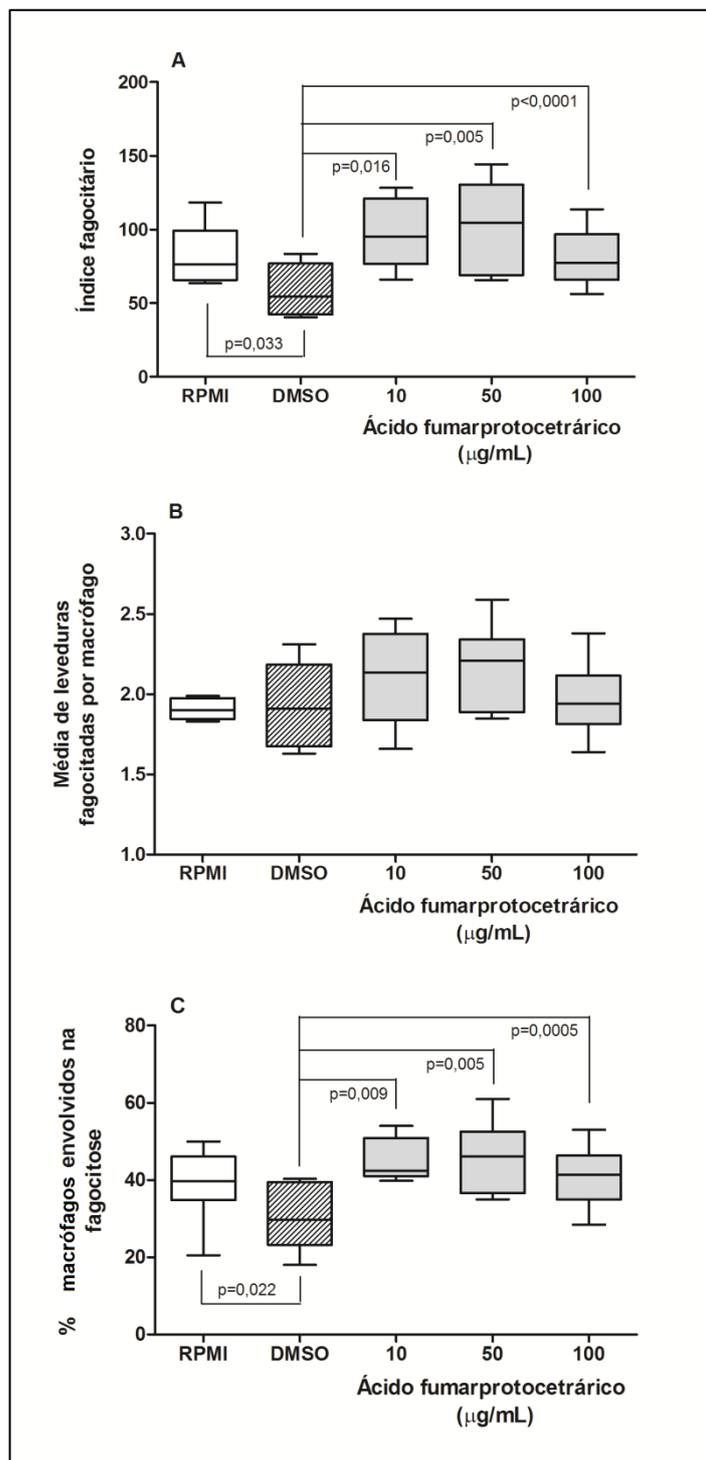


Figura 9: (A) Índice fagocitário, (B) média de leveduras fagocitadas, (C) percentual de macrófagos envolvidos na fagocitose. Os macrófagos peritoneais (2×10^5 células/escavação) foram incubados com uma suspensão contendo 1×10^6 *S. cerevisiae*/escavação, não sensibilizadas, em placa de microcultivo de 24 escavações, na presença ou não de ácido fumarprotocetrárico. Nas concentrações de 10, 50 ou 100 µg/mL, a droga aumentou o índice fagocitário devido ao aumento no percentual de macrófagos envolvidos na fagocitose (teste t pareado, $p < 0,05$). O diluente DMSO causou redução na capacidade fagocitária pela diminuição do percentual de macrófagos envolvidos na fagocitose (teste t pareado, $p < 0,05$). Estão representadas as medianas, os quartis, os valores máximos e mínimos e os pontos extremos.

B. Fagocitose por receptores para opsoninas

O ácido fumarprotocetrárico 10 ou 50 µg/mL interferiu na fagocitose de *S. cerevisiae* por macrófagos peritoneais de camundongos Swiss quando essa ocorreu por receptores para a porção Fc de imunoglobulinas.

A capacidade fagocitária, analisada pelo teste t pareado, aumentou na comparação com o controle DMSO (399,4), para 472,7 com 10 µg/mL ($p=0,008$), ou para 444,4 com 50 µg/mL ($p=0,010$), enquanto que com a maior concentração da droga (100 µg/mL), a fagocitose não foi afetada ($p=0,316$). O diluente DMSO 1,25% não afetou a fagocitose na comparação com o controle RPMI ($p=0,190$) (Figura 10A).

A média de leveduras ingeridas por macrófago, analisada pelo teste t pareado, subiu de 5,0, no controle DMSO, para 6,3 com 10 µg/mL ($p=0,015$) ou para 6,1 com 50 µg/mL ($p=0,054$). A maior concentração da droga (100 µg/mL) não afetou a média de leveduras ingeridas ($p=0,325$). A utilização do diluente DMSO 1,25% não afetou a média de leveduras ingeridas por macrófago (5,0) na comparação com o controle RPMI (6,1) ($p=0,070$) (Figura 10B).

Quando comparadas ao controle DMSO (74,4%), as diferentes concentrações do ácido fumarprotocetrárico não afetaram o percentual de macrófagos envolvidos na fagocitose, sendo de 77,2% para 10 µg/mL (teste t pareado, $p=0,649$), de 78,4% para 50 µg/mL (Wilcoxon, $p=0,812$) ou de 76,3% para 100 µg/mL (teste t pareado, $p=0,911$); semelhantemente, o diluente DMSO também não afetou o percentual de macrófagos envolvidos na fagocitose na comparação com o controle RPMI (69,7%) (teste t pareado, $p=0,420$) (Figura 10C).

FAGOCITOSE POR RECEPTORES PARA OPSONINAS

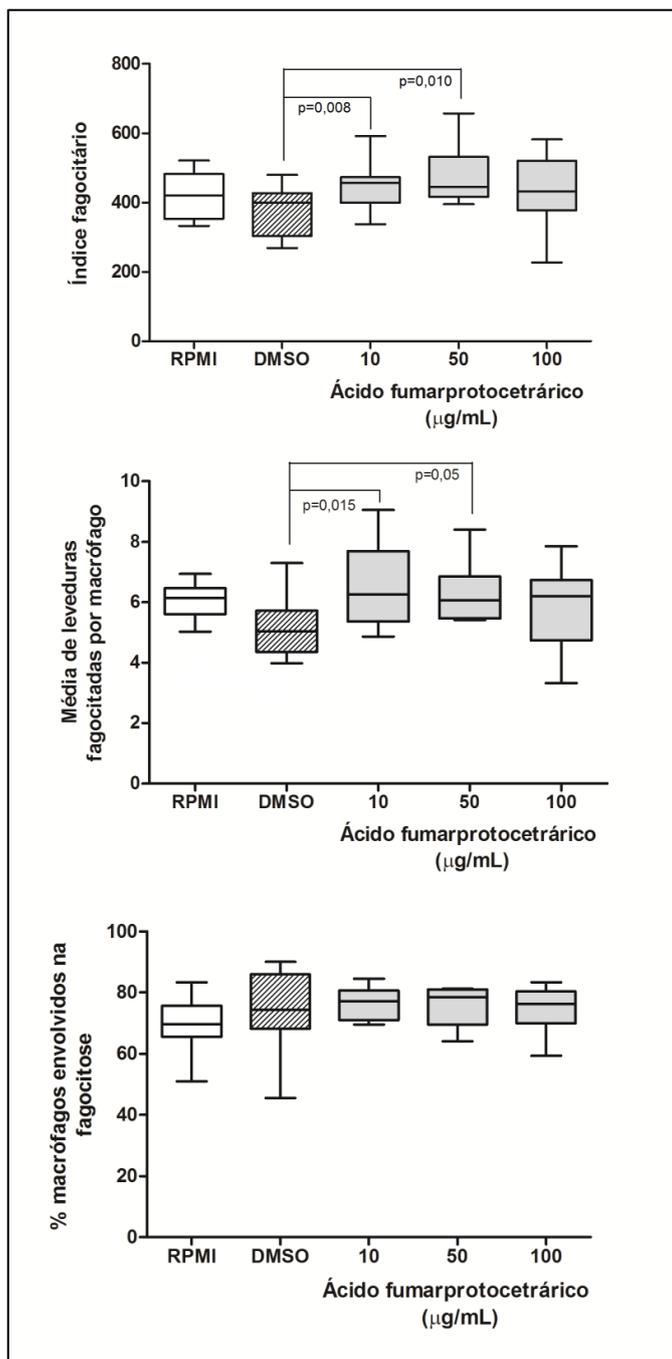


Figura 10: (A) Índice fagocitário, (B) média de leveduras fagocitadas, (C) proporção de macrófagos envolvidos na fagocitose. Os macrófagos peritoneais (2×10^5 células/escavação) foram incubados com uma suspensão de *S. cerevisiae* (1×10^6 /escavação), sensibilizadas com *pool* de soro fresco, em placa de microcultivo de 24 escavações, na presença ou não de ácido fumarprotocetrárico. Nas concentrações de 10 ou 50 µg/mL, a droga aumentou a mediana do índice fagocitário (teste t pareado, $p < 0,05$) devido ao aumento na média de leveduras fagocitadas (teste t pareado, $p < 0,05$). A maior concentração da droga (100 µg/mL) não afetou a capacidade fagocitária (teste t pareado, $p > 0,05$). O percentual de macrófagos envolvidos na fagocitose não foi afetado pelas diferentes concentrações do ácido fumarprotocetrárico ($p > 0,05$). A utilização do DMSO, como diluente, não afetou a capacidade fagocitária, a média de leveduras ingeridas e tampouco o percentual de macrófagos envolvidos na fagocitose, na comparação com o controle RPMI ($p > 0,05$). Estão representadas as medianas, os quartis, os valores máximos e mínimos e os pontos extremos.

4.5 Efeito do ácido fumarprotocetrário sobre a produção de citocinas por macrófagos peritoneais de camundongos Swiss

Devido ao pequeno número amostral ($n=3$) a produção de citocinas por macrófagos peritoneais foi avaliada pela comparação da variação do percentual de produção entre o controle RPMI e os controles LPS, DMSO e as diversas concentrações do ácido fumarprotocetrário (10, 50 ou 100 $\mu\text{g/mL}$).

A. Interleucina-6

Nossos resultados mostraram que os controles LPS e DMSO e as diferentes concentrações do ácido fumarprotocetrário provocaram um aumento no percentual de produção de IL-6 quando comparados ao controle RPMI (100%), sendo de 39.667% para o LPS, de 38.071% para o DMSO, de 38.662% para 10 $\mu\text{g/mL}$, de 38.915% para 50 $\mu\text{g/mL}$ e de 39.218% para 100 $\mu\text{g/mL}$ do ácido fumarprotocetrário. As diversas concentrações da droga (10, 50 ou 100 $\mu\text{g/mL}$) provocaram um aumento na produção de IL-6 similar ao aumento provocado pelo controle DMSO (Figura 11).

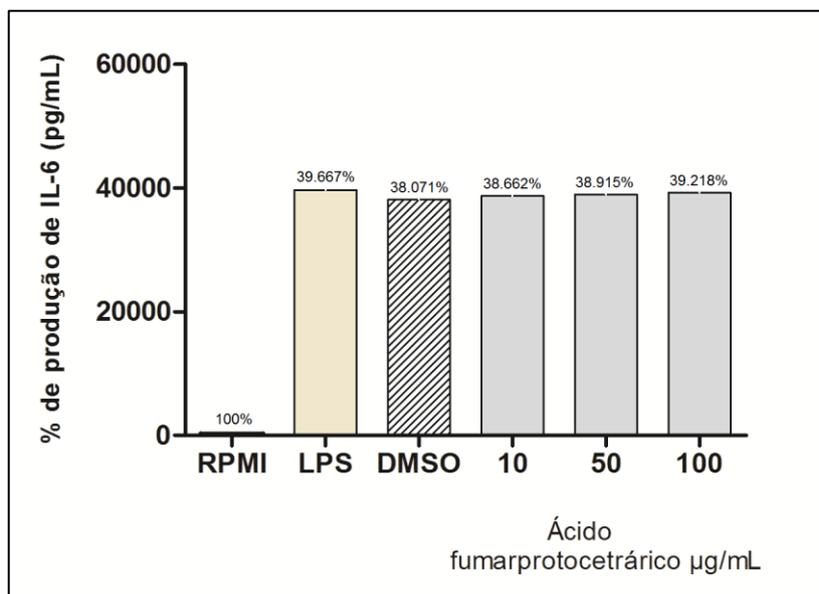


Figura 11. Percentual de produção de IL-6 por *pool* de células peritoneais de camundongos Swiss incubados com diferentes concentrações do ácido fumarprotocetrário (10, 50 ou 100 $\mu\text{g/mL}$). Os resultados mostraram que na comparação com o controle RPMI, os controles LPS e DMSO e as diversas concentrações da droga provocaram um aumento no percentual de produção de IL-6. As diversas concentrações da droga provocaram um aumento na produção de IL-6 similar ao aumento provocado pelo controle DMSO.

B. Interleucina-10

Nossos resultados mostraram que os controles LPS e DMSO e as diferentes concentrações do ácido fumarprotocetrário provocaram um aumento no percentual de produção de IL-10 quando comparados ao controle RPMI (100%), sendo de 152% para o LPS, de 311% para o DMSO, de 347% para 10 $\mu\text{g/mL}$, de 404% para 50 $\mu\text{g/mL}$ e de 388% para 100 $\mu\text{g/mL}$ do ácido fumarprotocetrário. As diversas concentrações da droga provocaram um aumento na produção de IL-10 quando comparadas ao aumento provocado pelo controle DMSO (Figura 12).

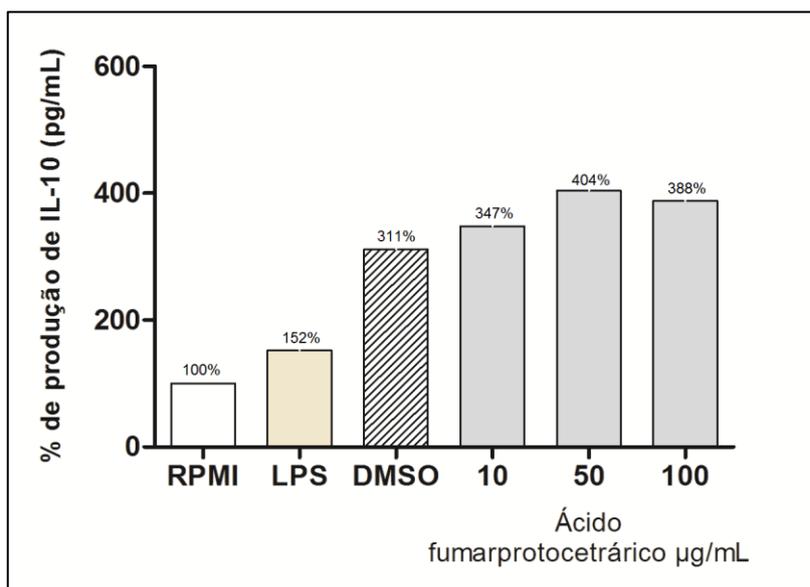


Figura 12. Percentual de produção de IL-10 por *pool* de células peritoneais de camundongos Swiss incubados com diferentes concentrações do ácido fumarprotocetrário (10, 50 ou 100 $\mu\text{g/mL}$). Os resultados mostraram que na comparação com o controle RPMI, os controles LPS e DMSO e as diversas concentrações da droga provocaram um aumento no percentual de produção de IL-10. As diversas concentrações da droga provocaram um aumento na produção de IL-10 quando comparadas ao aumento provocado pelo controle DMSO.

C. Interleucina-12

Nossos resultados mostraram que os controles LPS e DMSO e as diferentes concentrações do ácido fumarprotocetrário provocaram um aumento no percentual de produção de IL-12 quando comparados ao controle RPMI (100%), sendo de 248% para o LPS, de 208% para o DMSO, de 185% para 10 $\mu\text{g/mL}$, de 166% para 50 $\mu\text{g/mL}$ e de 186% para 100 $\mu\text{g/mL}$ do ácido fumarprotocetrário. As diversas concentrações da droga (10, 50 ou 100 $\mu\text{g/mL}$) provocaram uma diminuição na produção de IL-12 quando comparadas à produção provocada pelo controle DMSO (Figura 13).

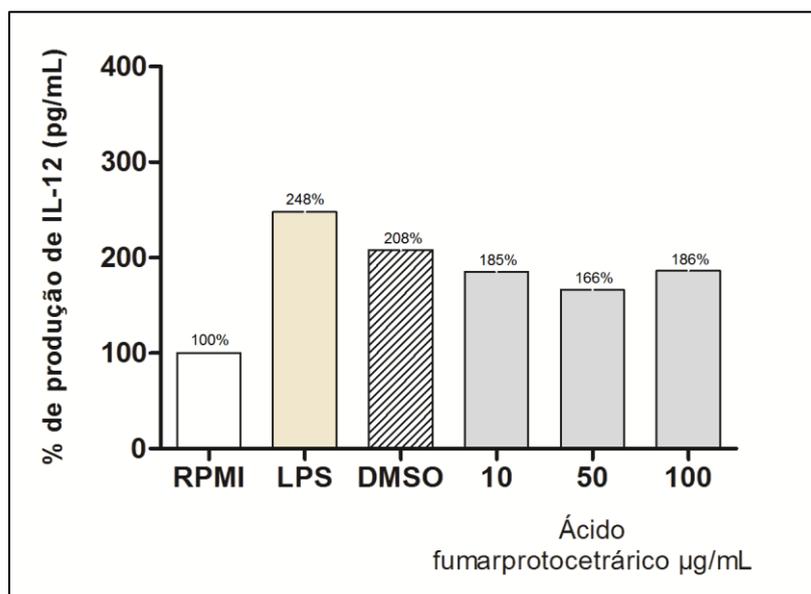


Figura 13. Percentual de produção de IL-12 por *pool* de células peritoneais de camundongos Swiss incubados com diferentes concentrações do ácido fumarprotocetrário (10, 50 ou 100 $\mu\text{g/mL}$). Os resultados mostraram que na comparação com o controle RPMI, os controles LPS e DMSO e as diversas concentrações da droga provocaram um aumento no percentual de produção de IL-12. As diversas concentrações da droga provocaram uma diminuição na produção de IL-12 quando comparadas à produção provocada pelo controle DMSO

D. Interleucina-23

Nossos resultados mostraram que os controles LPS e DMSO e as diferentes concentrações do ácido fumarprotocetrário provocaram um aumento no percentual de produção de IL-23 quando comparados ao controle RPMI (100%), sendo de 2.756% para o LPS, de 768% para o DMSO, de 2.033% para 10 µg/mL, de 2.359% para 50 µg/mL e de 2.472% para 100 µg/mL do ácido fumarprotocetrário. As diversas concentrações da droga provocaram um aumento na produção de IL-23 quando comparadas ao aumento provocado pelo controle DMSO (Figura 14).

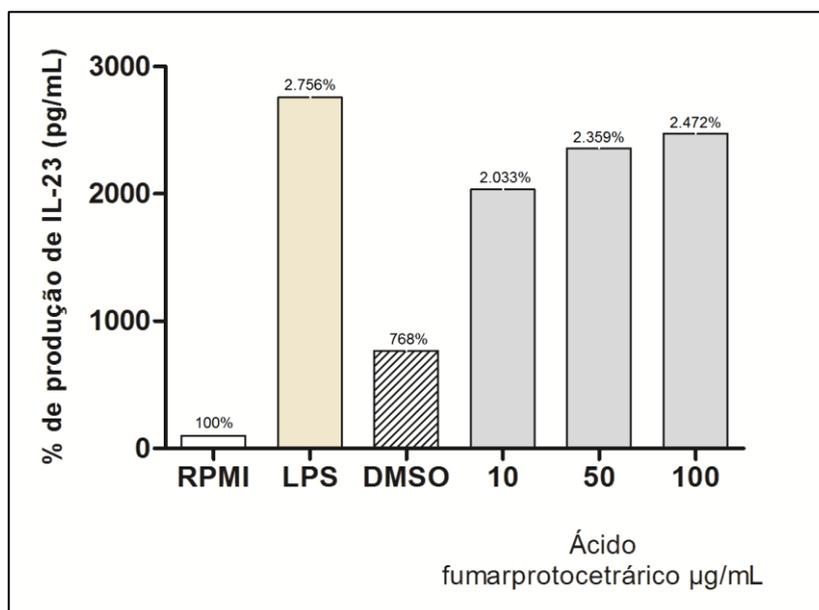


Figura 14. Percentual de produção de IL-23 por *pool* de células peritoneais de camundongos Swiss incubados com diferentes concentrações do ácido fumarprotocetrário (10, 50 ou 100 µg/mL). Os resultados mostraram que na comparação com o controle RPMI, os controles LPS e DMSO e as diversas concentrações da droga provocaram um aumento no percentual de produção de IL-23. As diversas concentrações da droga provocaram um aumento na produção de IL-23 quando comparadas ao aumento provocado pelo controle DMSO.

E. Proteína quimiotática de monócitos (MCP-1)

Nossos resultados mostraram que os controles LPS e DMSO e as diferentes concentrações do ácido fumarprotocetrárico provocaram um aumento no percentual de produção de MCP-1 quando comparados ao controle RPMI (100%), sendo de 1.720% para o LPS, de 1.802% para o DMSO, de 825% para 10 µg/mL, de 993% para 50 µg/mL e de 1.002% para 100 µg/mL do ácido fumarprotocetrárico. As diversas concentrações da droga (10, 50 ou 100 µg/mL) provocaram uma diminuição na produção de MCP-1 quando comparadas à produção provocada pelo controle DMSO (Figura 15).

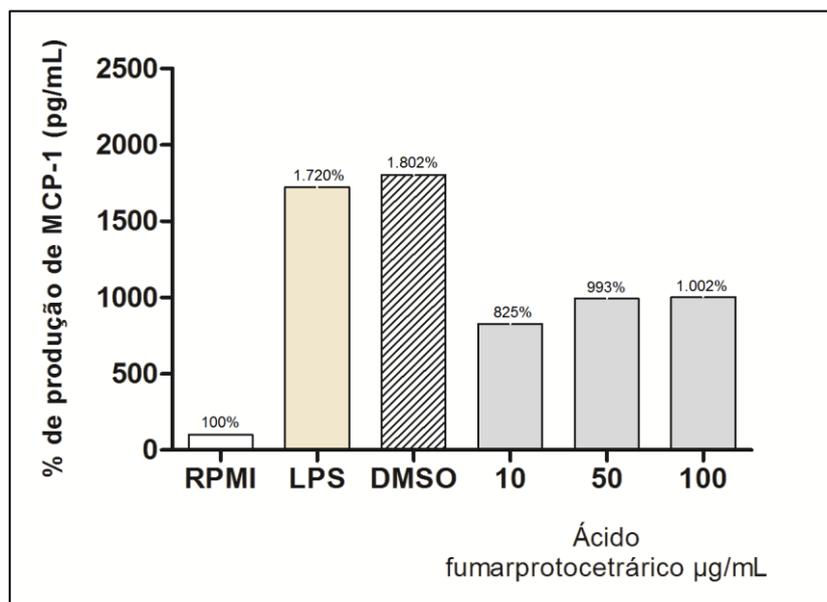


Figura 15. Percentual de produção de MCP-1 por *pool* de células peritoneais de camundongos Swiss incubados com diferentes concentrações do ácido fumarprotocetrárico (10, 50 ou 100 µg/mL). Os resultados mostraram que na comparação com o controle RPMI, os controles LPS e DMSO e as diversas concentrações da droga provocaram um aumento no percentual de produção de MCP-1. As diversas concentrações da droga provocaram uma diminuição na produção de MCP-1 quando comparadas à produção provocada pelo controle DMSO.

F. Fator de necrose tumoral

Nossos resultados mostraram que os controles LPS e DMSO e as diferentes concentrações do ácido fumarprotocetrário provocaram um aumento no percentual de produção de FNT quando comparados ao controle RPMI (100%), sendo de 360% para o LPS, de 498% para o DMSO, de 528% para 10 $\mu\text{g/mL}$, de 380% para 50 $\mu\text{g/mL}$ e de 388% para 100 $\mu\text{g/mL}$ do ácido fumarprotocetrário. O ácido fumarprotocetrário nas concentrações 50 ou 100 $\mu\text{g/mL}$ provocou uma diminuição na produção de FNT quando comparado à produção provocada pelo controle DMSO (Figura 16).

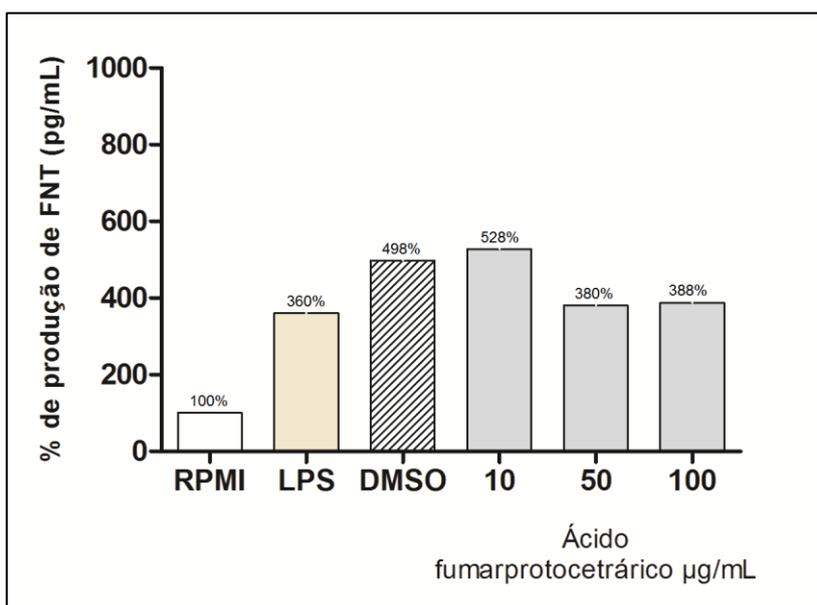


Figura 16. Percentual de produção de FNT por *pool* de células peritoneais de camundongos Swiss incubados com diferentes concentrações do ácido fumarprotocetrário (10, 50 ou 100 $\mu\text{g/mL}$). Os resultados mostraram que na comparação com o controle RPMI, os controles LPS e DMSO e as diversas concentrações da droga provocaram um aumento no percentual de produção de FNT. O ácido fumarprotocetrário nas concentrações de 50 ou 100 $\mu\text{g/mL}$ provocou uma diminuição na produção de FNT quando comparado à produção provocada pelo controle DMSO.

5. DISCUSSÃO

Diversos estudos têm sido efetuados com o objetivo de encontrar atividade antimicrobiana em substâncias extraídas de líquens (Zambare & Christopher 2012). Como o ácido fumarprotocetrárico tem demonstrado atividades antibacteriana e antifúngica (Yilmaz et al. 2004; Kosanic & Rankovic, 2011) o objetivo desse estudo foi avaliar o efeito desse ácido sobre a viabilidade e a função de macrófagos peritoneais de camundongos da linhagem Swiss em ensaios in vitro.

No estudo do efeito do ácido fumarprotocetrárico sobre a viabilidade de células peritoneais de camundongos observou-se que essas células permaneceram viáveis quando submetidas ao ácido fumarprotocetrárico nas concentrações de 10, 50 ou 100 µg/mL. Houve uma significativa elevação no percentual de redução de MTT, nessas concentrações, o que indicou um aumento na atividade mitocondrial. Nossos resultados sugerem que a utilização do DMSO 1,25% como diluente não afeta o metabolismo celular. Esses resultados são similares aos encontrados nos estudos de Carlos et al. em 2009, onde células peritoneais de camundongos mostraram-se viáveis quando incubadas com ácidos fenólicos extraídos dos líquens *Parmotrema dilatatum*, *Parmotrema lichexanthonicum* e *Ramalina sp.*

O aumento da atividade mitocondrial gera o aumento na produção de ATP por meio de uma cadeia transportadora de elétrons que é formada por um conjunto de moléculas localizadas na membrana interna das mitocôndrias. Durante a produção de ATP, radicais superóxido (O_2^-) são liberados e dismutados a H_2O_2 pela enzima Cobre, Zinco superóxido desmutase (Cu, Zn-SOD) no espaço intermembranar e pela manganês superóxido desmutase (Mn-SOD) na matriz mitocondrial (Kowaltowski et al. 2009; Cardoso et al. 2012).

O metabolismo energético das mitocôndrias é reconhecido hoje como uma das principais fontes de produção de peróxido de hidrogênio, porém a produção pela via das NADPH oxidases em fagócitos também é importante (Martino & Castello 2011).

Com a finalidade de matar microrganismos que são ingeridos por fagocitose, os macrófagos geram espécies reativas de oxigênio (Bedard & Krause 2007). Quando ativadas, essas células mudam o seu metabolismo e acontece um aumento no consumo de oxigênio, que pode atingir níveis até 50 vezes maiores do que quando essas células estão em repouso. Ao mesmo tempo, acontece um substancial aumento na oxidação da glicose via hexose monofosfato com produção de Nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADPH) (Pick & Keisari 1980). A NADPH oxidase é uma enzima que catalisa a produção de superóxido (O_2^-) a partir de oxigênio e NADPH. Nos macrófagos em repouso, as subunidades da NADPH oxidase estão localizadas, separadamente, na membrana e no citosol. Após ativação dos macrófagos, esses componentes se unem possibilitando a transferência de elétrons do NADPH para o oxigênio molecular, resultando na geração de íon superóxido (O_2^-), e esse, por dismutação espontânea ou por meio da enzima superóxido dismutase, é transformado em H_2O_2 (Babior 2004) que é utilizado pela enzima mieloperoxidase para converter íons halídeos em ácidos hipo-halosos que podem reagir e matar microrganismos (Segal 2005).

Os macrófagos foram testados quanto à produção de peróxido de hidrogênio e os nossos resultados mostraram que a produção diminuiu quando as células foram incubadas com 10 $\mu\text{g/mL}$ do ácido e aumentou quando incubadas com as concentrações de 50 ou 100 $\mu\text{g/mL}$. É possível que esse ácido interfira na cadeia transportadora de elétrons das mitocôndrias e/ou na montagem das subunidades da NADPH oxidase de modo a aumentar ou diminuir a geração de O_2^- e, por conseguinte, a formação de H_2O_2 . O resultado sugere que em menores concentrações o ácido exerce uma atividade antioxidante e que passa a ter uma atividade pró-oxidante à medida que a concentração aumenta.

A influência do ácido fumarprotocetrárico sobre produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais também foi avaliada. Essas células produzem óxido nítrico pela ação da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS). A expressão de iNOS em macrófagos é controlada por estímulos microbianos e por citocinas, primariamente por indução transcricional. A iNOS catalisa a conversão da arginina

em citrulina, e assim, o óxido nítrico é liberado (Moncada et al. 1991; Macmicking et al. 1997). Nossos resultados mostraram que o ácido fumarprotocetrárico nas concentrações de 10, 50 ou 100 µg/mL não afetou a produção de óxido nítrico, sendo possível sugerir que esse ácido não interfere nas vias de produção desse óxido.

A capacidade fagocitária, considerando receptores para padrões moleculares associados a patógenos, mostrou que o ácido fumarprotocetrárico 10, 50 ou 100 µg/mL provocou um aumento significativo no percentual de macrófagos envolvidos na fagocitose e no índice fagocitário. Quando a capacidade fagocitária foi avaliada considerando os receptores para o complemento e a porção Fc de imunoglobulinas (IgG), o ácido, nas concentrações de 10 ou 50 µg/mL, provocou um aumento significativo na média de leveduras fagocitadas e no índice fagocitário.

Durante a fagocitose, receptores dos tipos Fc, do complemento, *scavengers*, lectinas e Toll-like simultaneamente reconhecem micróbios pela ligação direta ou por ligação a opsoninas sobre a superfície dos microrganismos. Eventos como a polimerização da actina e alterações no tráfego da membrana ocorrem durante esse processo (Underhill & Ozinsky 2002). Os resultados sugerem que o ácido fumarprotocetrárico interfere nesses eventos e conseqüentemente interfere na capacidade fagocitária dos macrófagos.

Para finalizar, avaliamos o efeito do ácido fumarprotocetrárico sobre a produção de IL-6, IL-10, IL-12, IL-23, MCP-1 e FNT por macrófagos peritoneais de camundongos.

A IL-6 é produzida por macrófagos, células endoteliais, células T e tem papel importante na regulação imunológica, hematopoese e oncogênese. É secretada por macrófagos nas respostas contra moléculas microbianas específicas, aumenta a produção de neutrófilos na medula óssea, estimula a síntese de proteínas de fase aguda, promove o desenvolvimento de células B e é antagonista para células T reguladoras (Guo et al. 2012).

Produzida por macrófagos e células T, a IL-10 é uma potente inibidora de citocinas, de mediadores solúveis e de moléculas da superfície celular. Ela inibe principalmente a secreção de IL-12, FNT e MCP-1, prejudicando a ativação de células de origem mielóide e inibindo as respostas imunes inflamatórias (Moore et al. 2001).

Macrófagos e células dendríticas produzem a IL-12, que é estimuladora de células T e Natural Killer (NK); é ainda indutora e mantenedora de respostas do tipo Th1, além de ser importante para a manutenção da produção de Interferon- γ por células T e NK (Brombacher et al. 2003).

A IL-23, produzida por macrófagos e células dendríticas, estimula subconjuntos de células T a produzirem IL-17; e essa, por sua vez, induz a produção de citocinas pró-inflamatórias, as quais contribuem para a autoimunidade ou para respostas protetoras durante infecções (Hunter, 2005). Brereton et al. (2009) mostraram que a via ERK-MAPK é a principal rota de transdução de sinal envolvida na produção de IL-23.

O MCP-1, produzido por uma variedade de tipos celulares, constitutivamente ou após indução por estresse oxidativo, citocinas ou fatores de crescimento, é conhecido por regular a migração e infiltração de monócitos/macrófagos (Deshmane et al. 2009).

O FNT produzido por macrófagos e células T, é um mediador das respostas inflamatórias agudas e tem como principal função o recrutamento de neutrófilos e monócitos para os sítios de infecção (Locksley et al. 2001).

Compostos fenólicos têm sido descritos como moduladores de NF κ B por interferirem na indução de uma grande variedade de genes que codificam citocinas e quimiocinas (Santangelo et al. 2007). O ácido úsnico, um composto fenólico extraído de líquen, inibe a produção de FNT por meio da supressão da ativação de NF κ B (Jin et al. 2008). Nossos resultados mostraram que é possível que o ácido fumarprotocetrárico interfira na produção das citocinas anteriormente citadas, porém, o DMSO, um solvente anfipático usado em estudos biológicos (Wang et al. 2012), comumente utilizado como diluente de metabólitos

secundários de líquens em estudos sobre atividade imunomodulatória (Santos et al. 2004) e antimicrobiana (Kosanic & Rankovic 2011) provocou, em nossos estudos, aumento no percentual de produção de IL-6, IL-10, IL-12, IL-23, MCP-1 e FNT.

O diluente DMSO também provocou alteração na produção de óxido nítrico e na capacidade fagocitária de macrófagos peritoneais. Esses resultados sugerem que o DMSO pode não ser o diluente ideal para o ácido fumarprotocetrárico quando esse for destinado à aplicação em sistemas biológicos.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho permitem as seguintes conclusões:

1. As diferentes concentrações do ácido fumarprotocetrárico (10, 50 ou 100 µg/mL) foram capazes de aumentar o metabolismo das células peritoneais dos camundongos Swiss;
2. O tratamento dos macrófagos peritoneais com o ácido fumarprotocetrárico diminuiu a produção de H₂O₂ com 10 µg/mL, mas aumentou essa produção com 50 ou 100 µg/mL;
3. Nenhuma das concentrações do ácido fumarprotocetrárico (10, 50 ou 100 µg/mL) foi capaz de afetar a produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais de camundongos;
4. As três concentrações do ácido fumarprotocetrárico (10, 50 ou 100 µg/mL) aumentaram a fagocitose por macrófagos peritoneais, quando essa foi mediada por receptores para padrões moleculares de patógenos, devido ao aumento no percentual de células envolvidas na fagocitose. Quando a fagocitose foi mediada por receptores para opsoninas, 10 ou 50 µg/mL da droga aumentaram a capacidade fagocitária pela elevação da média de leveduras ingeridas por macrófagos;
5. O tratamento dos macrófagos peritoneais dos camundongos com as diferentes concentrações do ácido fumarprotocetrárico (10, 50 ou 100 µg/mL) provocou interferência no percentual de produção de IL-10, IL-12, IL-23, MCP-1 e FNT;
6. O uso do diluente DMSO 1,25% provocou a diminuição da capacidade fagocitária de macrófagos, diminuição na produção de óxido nítrico e interferência no percentual de produção de IL-6, IL-10, IL-12, IL-23, MCP-1 e FNT.

Nosso trabalho permitiu determinar o efeito imunomodulador do ácido fumarprotocetrárico sobre macrófagos peritoneais e aponta para o seu potencial no desenvolvimento de novas drogas.

7. LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS

Apontamos como limitação nesse trabalho o uso do diluente DMSO 1,25%, pois os nossos resultados mostraram que esse diluente provocou a diminuição da capacidade fagocitária e da produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais, além de provocar interferência no percentual de produção de IL-6, IL-10, IL-12, IL-23, MCP-1 e FNT por essas células.

O número amostral nos ensaios para avaliação da influência do ácido fumarprotocetrárico sobre a produção de citocinas foi pequeno (n=3) o que impossibilitou a aplicação de testes estatísticos.

Podemos sugerir como perspectivas futuras a busca por outro diluente para o ácido fumarprotocetrárico ou ensaios com menores concentrações de DMSO, além da continuidade dos estudos referentes à avaliação das atividades imunomodulatórias desse ácido.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ahmadjian V. Lichens. *Annual Review of Microbiology*. 1965;19:1-20.
2. Babior BM. NADPH oxidase. *Current Opinion Immunology*. 2004;16(1):42-7.
3. Bax R, Mullan N, Verhoef J. The millennium bugs - the need for and development of new antibacterials. *International journal of antimicrobial agents*. 2000;16(1):51-9.
4. Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiological reviews*. 2007;245-313.
5. Brereton CF, Sutton CE, Lalor SJ, Lavelle EC, Mills KH. Inhibition of ERK MAPK suppresses IL-23- and IL-1-driven IL-17 production and attenuates autoimmune disease. *J Immunol*. 2009;183(3):1715-23
6. Brombacher F, Kastelein RA, Alber G. Novel IL-12 family members shed light on the orchestration of Th1 responses. *Trends in immunology*. 2003;24(4):207-12.
7. Cardoso AR, Chausse B, da Cunha FM, Luevano-Martinez LA, Marazzi TB, Pessoa OS, et al. Mitochondrial compartmentalization of redox processes. *Free radical biology & medicine*. 2012;52(11-12):2201-8.
8. Carlos IZ, Quilles MB, Carli CB, Maia DC, Benzatti FP, Lopes TI, et al. Lichen metabolites modulate hydrogen peroxide and nitric oxide in mouse macrophages. *Zeitschrift fur Naturforschung C, Journal of biosciences*. 2009;64(9-10):664-72
9. Cornaglia G, Lonroth A, Struelens M. Report from the European Conference on the Role of Research in Combating Antibiotic Resistance, 2003. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2004;10(5):473-97.

10. Cueva C, Moreno-Arribas MV, Martin-Alvarez PJ, Bills G, Vicente MF, Basilio A, et al. Antimicrobial activity of phenolic acids against commensal, probiotic and pathogenic bacteria. *Research Microbiology*. 2010;161(5):372-82.
11. Culberson WL. Lichen biology: biology of lichenized fungi. *Science*. 1985;228(4703):1084.
12. Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *Journal of interferon cytokine research: the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*. 2009;29(6):313-26.
13. Elix JA. Biochemistry and secondary metabolites. In: NASH III TH, editor. *Lichen Biology*. Cambridge: Cambridge University Press, 1996;154 - 181.
14. Fahselt D. Carbon metabolism in lichens. *Symbiosis*. 1994;17:127-82
15. Freysdottir J, Omarsdottir S, Ingolfsdottir K, Vikingsson A, Olafsdottir ES. In vitro and in vivo immunomodulating effects of traditionally prepared extract and purified compounds from *Cetraria islandica*. *International immunopharmacology*. 2008;8(3):423-30.
16. Giedraitiene A, Vitkauskiene A, Naginiene R, Pavilionis A. Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria. *Medicina (Kaunas)*. 2011;47(3):137-46.
17. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Analytical biochemistry*. 1982;126(1):131-8.
18. Guo Y, Xu F, Lu T, Duan Z, Zhang Z. Interleukin-6 signaling pathway in targeted therapy for cancer. *Cancer treatment reviews*. 2012,
19. Harvey AL. Natural products as a screening resource. *Current opinion in chem Biology*. 2007;11(5):480-4.

20. Honda NK, Vilegas W. A química dos líquens. *Quimica Nova*, 1998;22(1).
21. Honegger R, Scherrer S. Sexual reproduction in lichen-forming ascomycetes. In: NASH III TH, editor. *Lichen Biology*. Cambridge: Cambridge University Press, 1996;94-102.
22. Hunter CA. New IL-12-family members: IL-23 and IL-27, cytokines with divergent functions. *Nature reviews Immunology*. 2005;5(7):521-31.
23. Ingólfssdóttir K. Usnic acid. *Phytochemistry*. 2002;61(7):729-36.
24. Jin JQ, Li CQ, He LC. Down-regulatory effect of usnic acid on nuclear factor-kappaB-dependent tumor necrosis factor-alpha and inducible nitric oxide synthase expression in lipopolysaccharide-stimulated macrophages RAW 264.7. *Phytotherapy research: PTR*. 2008;22(12):1605-9.,
25. Kosanic M, Rankovic B. Antioxidant and antimicrobial properties of some lichens and their constituents. *Journal of Medicinal Food*. 2011;14(12):1624-30.
26. Kosugi M, Arita M, Shizuma R, Moriyama Y, Kashino Y, Koike H, et al. Responses to desiccation stress in lichens are different from those in their photobionts. *Plant & Cell Physiology*. 2009;50(4):879-88.
27. Kowaltowski AJ, de Souza-Pinto NC, Castilho RF, Vercesi AE. Mitochondria and reactive oxygen species. *Free radical biology & medicine*. 2009;47(4):333-43.
28. Lachmann, P. J., and M. J. Hobart. 1978. Complement technology, p. 1A-5A. In D. M. Weir (ed.), *Handbook of experimental immunology*, vol. I. *Immunochemistry*. Blackwell, Oxford, United Kingdom.
29. Leeds JA, Schmitt EK, Krastel P. Recent developments in antibacterial drug discovery: microbe-derived natural products - from collection to the clinic. *Expert opinion on investigational drugs*. 2006;15(3):211-26.

30. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*. 2001;104(4):487-501.
31. Macmicking J, Xie QW, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. *Annual Review of Immunology*. 1997;15:323-50.
32. Martino CF, Castello PR. Modulation of hydrogen peroxide production in cellular systems by low level magnetic fields. *PLoS One*. 2011;6(8):e22753.
33. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacological Reviews*. 1991;43(2):109-42.
34. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annual Review of Immunology*. 2001;19:683-765.
35. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 1983;65(1-2):55-63.
36. Muller, K. Pharmaceutically relevant metabolites from lichens. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2001;56(1-2):9-16.
37. Muniz-Junqueira MI, Pecanha LM, da Silva-Filho VL, de Almeida Cardoso MC, Tosta CE. Novel microtechnique for assessment of postnatal maturation of the phagocytic function of neutrophils and monocytes. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. 2003;10(6):1096-102.
38. Norrby SR, Nord CE, Finch R. Lack of development of new antimicrobial drugs: a potential serious threat to public health. *The Lancet infectious diseases*. 2005;5(2):115-9.

39. Pick E, Keisari Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *Journal of immunological methods*. 1980;38(1-2):161-70.
40. Rankovic BR, Kosanic MM, Stanojkovic TP. Antioxidant, antimicrobial and anticancer activity of the lichens *Cladonia furcata*, *Lecanora atra* and *Lecanora muralis*. *BMC Complementary and alternative medicine*. 2011;11:97.
41. Roses Periago M. Antimicrobial resistance: a risk factor for infectious diseases. *Revista panamericana de salud publica = Pan American journal of public health*. 2011;30(6):507-8.
42. Santangelo C, Vari R, Scazzocchio B, Di Benedetto R, Filesi C, Masella R. Interleukin-6 signaling pathway in targeted therapy for cancer Polyphenols, intracellular signalling and inflammation. *Annali dell'Istituto superiore di Sanita*. 2007;43(4):394-405.
43. Santos LC, Honda NK, Carlos IZ, Vilegas W. Intermediate reactive oxygen and nitrogen from macrophages induced by Brazilian lichens. *Fitoterapia* 2004;75(5):473-9.
44. Segal AW. How neutrophils kill microbes. *Annual Review of Immunology*. 2005;23:197-223.
45. Theuretzbacher U. Resistance drives antibacterial drug development. *Current Opinion in Pharmacology*. 2011;11(5):433-8.
46. Underhill DM, Ozinsky A. Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annual Review of Immunology*. 2002;20:825-52.
47. Van Haluwyn C. [Lichens: the original symbiotic organism]. *Annales pharmaceutiques françaises*. 1999;57(6):448-54.

48. Wang CC, Lin SY, Lai YH, Liu YJ, Hsu YL, Chen JJ. Dimethyl sulfoxide promotes the multiple functions of the tumor suppressor HLJ1 through activator protein-1 activation in NSCLC cells. PLoS One. 2012;7(4):e33772.
49. World Health Organization. Global report for research on infectious diseases of poverty. 2012a. Disponible em: http://whqlibdoc.who.int/publications/2012/9789241564489_eng.pdf
50. World Health Organization. WHO Global strategy for containment of Antimicrobial resistance. 2012b. Disponible em: [http://www.who.int/drugresistance/WHO Global Strategy English. pdf](http://www.who.int/drugresistance/WHO%20Global%20Strategy%20English.pdf)
51. World Health Organization. Drug resistance. 2012c. Disponible em: <http://www.who.int/drugresistance/en/index.html>
52. Yasuhiko Asahina SS. Chemistry of lichen substances. Japan Society for the Promotion of Science; 1954.
53. Yilmaz M, The antimicrobial activity of extracts of the lichen *Cladonia foliacea* and its (-)-usnic acid, atranorin, and fumarprotocetraric acid constituents. Zeitschrift fur Naturforschung C, Journal of biosciences. 2004;59(3-4):249-54.
54. Zambare VP, Christopher LP. Biopharmaceutical potential of lichens. Pharmaceutical Biology. 2012;50(6):778-98.

ANEXO I

(Parecer do Comitê de Ética)



**Faculdade de Medicina
Universidade de Brasília
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/FM**



Brasília, 25 de abril de 2012

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado “Avaliação da toxicidade e influência de alcaloides oriundos dos líquens Parmotrema tinctorum e Cladonia verticillaris sobre macrófagos peritoneais de camundogos swiss”, UnBDoc 44694/2012, sob responsabilidade da Selma Aparecida Souza Kuckelhaus, foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-FM) da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília.

Prof. Dr. Carlos Eduardo Gaio V. dos Santos
Coordenador do CEUA-FM

ANEXO II

(Soluções, meios e Reagentes)

Líquido de Türk

Ácido acético glacial 1,5 mL
Violeta de genciana a 1% 1,0 mL
Água destilada 100 mL

Solução de nigrosina 0,05%

Nigrosina 0,05 g
Tampão fosfato 100 mL
Filtrar e colocar em frasco âmbar
Estocar a 4°C

Solução Salina Tamponada com fosfato (STF) pH 7,2, 153 M (1x)

Na₂HPO₄ anidro (mm: 141,96 g/mol) 8,15 g
KH₂PO₄ anidro (mm: 136,10 g/mol) 2,45 g
NaCl (mm: 58,44 g/mol) 4,50 g
Água destilada 1000 mL

Meio de cultura RPMI 1640, PH 7,2, 1640**b) Meio estoque**

Meio RPMI 1640, PH 7,2, (Sigma) 10,4 g
Tampão Hepes (Sigma, mm: g/mol) 5,96 g
Hipoxantina 2,50 mg
Gentamicina 25,0 mg
Água bidestilada 1000 mL
Filtrar em membrana de 0,22 µL Guardar a 4°C por um mês

b) Meio RPMI 1640, pH 7,2 (incompleto)

RPMI 1640, PH 7,2, 1640 (sol. Estoque) 97,36 mL
NaH₂CO₃ 7,5% 2,64 µL

c) Meio RPMI 1640, pH 7,2, (completo)

RPMI 1640, PH 7,2, 1640 (sol. Estoque) 87,36 mL
NaH₂CO₃ a 7,5% 2,64 mL
Soro fetal bovino 10,0 mL

Bicarbonato de sódio 7,5%

Pesar 7,5 g de bicarbonato de sódio
Dissolver em 100 mL de água bidestilada
Filtrar com filtro 0,02 µm

Solução de vermelho de fenol 0,028 M

b) Solução estoque: Vermelho de fenol (Merck) 9,92 g

Água bidestilada 1000 mL

b) Solução de uso: Peroxidase (85unidades) 200 µL

Vermelho de fenol 200 µL

Tampão fosfato 9,6 mL

Solução de Greiss

b) Solução estoque:

Solução estoque de sulfanilamida a 2% em H₃PO₄ a 5%

Sal sulfanilamida (Sigma) 500 mg

H₃PO₄ a 5% 25 mL

(2,5 mL H₃PO₄ + 47,5 mL de H₂O bidestilada)

NEED 0,2%

N-1-naphtylethylenediamine (Sigma) 50 mg

Água bidestilada 25 mL

b) Solução de uso:

Sulfanilamida 2% 10 mL

NEED 0,2 % 10 mL

OBS: Preparar 01 hora antes do término do período de incubação

ANEXO III

(Planilhas e tabelas)

Tabela 1. Efeito do ácido fumarprotocetrárico sobre a viabilidade dos macrófagos peritoneais de camundongos Swiss após a incubação por 4 horas na presença de MTT.

	Grupos				
	RPMI	DMSO	10 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL
	Percentual	de	redução	do	MTT
Animal 1	100	115,89	123,57	122,14	107,09
Animal 2	100	118,08	138,02	135,86	101,57
Animal 3	100	101,64	116,94	133,22	121,36
Animal 4	100	101,28	108,97	137,66	112,66
Animal 5	100	100,87	113,00	135,36	128,35
Animal 6	100	97,50	104,28	134,22	134,00
Animal 7	100	101,36	111,54	141,60	139,36
Animal 8	100	96,14	100,74	110,85	144,55

Tabela 2. Efeito do ácido fumarprotocetrárico sobre a capacidade fagocitária de macrófagos peritoneais de camundongos Swiss incubados com 1×10^6 *Saccharomyces cerevisiae* na presença de soro fetal bovino (A, B e C).

A.

	Índice Fagocitário				
	Grupos				
	RPMI	DMSO	10 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL
Animal 1	33,0	41,5	102,0	111,5	56,0
Animal 2	118,3	79,3	104,5	136,8	113,8
Animal 3	99,3	57,0	128,3	110,3	72,8
Animal 4	76,3	40,3	126,8	67,3	65,8
Animal 5	86,5	70,3	66,0	144,3	87,0
Animal 6	75,0	83,3	73,0	65,8	100,0
Animal 7	63,5	44,8	88,3	74,5	66,3
Animal 8	65,8	52,3	87,0	99,0	82,0

B.

Média de leveduras fagocitadas					
	Grupos				
	RPMI	DMSO	10 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL
Animal 1	1,61	2,31	2,37	2,29	1,96
Animal 2	2,56	2,01	2,10	2,59	2,15
Animal 3	1,99	2,21	2,38	2,13	1,64
Animal 4	1,97	1,81	2,47	1,91	1,92
Animal 5	1,91	1,75	1,66	2,36	1,85
Animal 6	1,85	2,11	1,75	1,88	2,38
Animal 7	1,83	1,63	2,15	1,85	1,80
Animal 8	1,89	1,65	2,12	2,29	2,01

C.

% de macrófagos envolvidos na fagocitose					
	Grupos				
	RPMI	DMSO	10 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL
Animal 1	20,5	18,0	43,0	48,8	28,5
Animal 2	46,3	39,5	49,8	52,8	53,0
Animal 3	50,0	25,8	54,0	51,8	44,3
Animal 4	38,8	22,3	51,3	35,3	34,3
Animal 5	45,3	40,3	39,8	61,0	47,0
Animal 6	40,5	39,5	41,8	35,0	42,0
Animal 7	34,8	27,5	41,0	40,3	36,8
Animal 8	34,8	31,8	41,0	43,3	40,8

Tabela 3. Efeito do ácido fumarprotocetrárico sobre a capacidade fagocitária de macrófagos peritoneais de camundongos Swiss incubados com 1×10^6 *Saccharomyces cerevisiae* na presença de soro fresco (A, B e C).

A.

Índice Fagocitário					
	Grupos				
	RPMI	DMSO	10 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL
Animal 1	332,5	294,8	399,0	413,5	385,8
Animal 2	434,0	268,5	337,5	395,5	476,8
Animal 3	339,8	387,5	453,8	445,5	520,8
Animal 4	420,0	331,5	592,0	476,0	518,8
Animal 5	420,8	415,5	473,3	443,3	227,3
Animal 6	391,8	479,3	472,0	549,8	375,8
Animal 7	521,3	431,5	399,5	424,5	388,0
Animal 8	498,0	411,3	458,9	761,4	582,5

B.

Média de leveduras fagocitadas					
	Grupos				
	RPMI	DMSO	10 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL
Animal 1	6,52	4,17	5,25	6,19	6,51
Animal 2	6,16	3,98	4,86	6,18	6,17
Animal 3	5,03	4,97	5,71	5,48	6,81
Animal 4	6,11	7,29	7,01	5,95	6,23
Animal 5	5,46	5,11	6,48	5,46	3,32
Animal 6	6,05	5,33	6,03	7,07	4,62
Animal 7	6,26	4,93	5,51	5,41	5,11
Animal 8	6,94	5,85	6,65	9,73	7,85

C.

% de macrófagos envolvidos na fagocitose					
	Grupos				
	RPMI	DMSO	10 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL
Animal 1	51,0	70,8	76,0	66,8	59,3
Animal 2	70,5	67,5	69,5	64,0	77,3
Animal 3	67,5	78,0	79,5	81,3	76,5
Animal 4	68,8	45,5	84,5	80,0	83,3
Animal 5	77,0	81,3	73,0	81,3	68,5
Animal 6	64,8	90,0	78,3	77,8	81,3
Animal 7	83,3	87,5	72,5	78,5	76,0
Animal 8	71,8	70,3	69,0	78,3	74,3

Tabela 4. Efeito do ácido fumarprotocetrárico sobre a produção de peróxido de hidrogênio por macrófagos peritoneais de camundongos Swiss.

Produção de peróxido de hidrogênio (µM)						
	Grupos					
	RPMI	PMA	DMSO	10 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL
Animal 1	0,78	5,06	0,87	0,40	4,86	19,61
Animal 2	0,52	1,23	1,10	0,31	4,05	20,68
Animal 3	0,82	0,97	0,72	0,16	3,83	21,49
Animal 4	0,65	2,20	0,28	0,68	4,27	21,36
Animal 5	0,56	2,55	2,90	0,68	4,59	21,76
Animal 6	1,38	6,39	8,97	2,35	8,50	25,95
Animal 7	0,52	2,45	5,25	2,12	7,61	20,48
Animal 8	1,97	1,16	5,35	2,61	6,02	23,38

Tabela 5. Efeito do ácido fumarprotocetrárico sobre a produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais de camundongos Swiss.

Produção de óxido nítrico (μM)						
Grupos						
	RPMI	LPS	DMSO	10 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$
Animal 1	17,59	30,42	6,07	8,52	9,31	8,65
Animal 2	11,57	13,04	5,22	6,93	6,67	6,53
Animal 3	19,88	27,37	10,04	10,84	12,11	12,37
Animal 4	26,35	79,43	17,05	14,38	15,99	22,17
Animal 5	16,79	27,05	7,86	7,99	7,46	10,24
Animal 6	7,46	12,24	4,82	4,56	5,74	5,22
Animal 7	16,46	34,71	6,47	5,09	5,61	24,49
Animal 8	16,85	37,58	8,85	7,33	8,25	8,12

Tabela 6. Efeito do ácido fumarprotocetrárico sobre a produção de IL-6 por *pool* (n=3) de macrófagos peritoneais de camundongos Swiss.

Produção de IL-6 (pg/mL)						
Grupos						
	RPMI	LPS	DMSO	10 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$
<i>Pool 1</i>	6,785	2343,875	2293,570	2305,239	2308,296	2324,162
<i>Pool 2</i>	3,990	2362,090	2265,115	2308,429	2334,472	2334,204
<i>Pool 3</i>	9,657	2439,098	2282,868	2332,595	2338,633	2404,468

Tabela 7. Efeito do ácido fumarprotocetrário sobre a produção de IL-10 por *pool* (n=3) de macrófagos peritoneais de camundongos Swiss.

Produção de IL-10 (pg/mL)						
Grupos						
	RPMI	LPS	DMSO	10 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL
<i>Pool 1</i>	25,893	53,136	144,999	124,270	161,237	106,946
<i>Pool 2</i>	53,596	78,765	144,242	125,873	156,947	183,183
<i>Pool 3</i>	53,596	55,990	56,087	175,700	159,555	219,115

Tabela 8. Efeito do ácido fumarprotocetrário sobre a produção de IL-12 por *pool* (n=3) de macrófagos peritoneais de camundongos Swiss.

Produção de IL-12 (pg/mL)						
Grupos						
	RPMI	LPS	DMSO	10 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL
<i>Pool 1</i>	3,412	5,500	6,362	4,714	3,784	4,772
<i>Pool 2</i>	2,601	6,619	7,170	5,721	4,960	6,554
<i>Pool 3</i>	3,063	10,027	4,983	6,032	6,032	5,126

Tabela 9. Efeito do ácido fumarprotocetrário sobre a produção de IL-23 por *pool* (n=3) de macrófagos peritoneais de camundongos Swiss.

Produção de IL-23 (pg/mL)						
Grupos						
	RPMI	LPS	DMSO	10 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL
<i>Pool 1</i>	6,896	199,340	50,665	149,9820	165,992	198,231
<i>Pool 2</i>	8,775	231,302	70,580	164,0030	170,432	190,329
<i>Pool 3</i>	7,310	200,452	55,992	150,3200	199,341	173,540

Tabela 10. Efeito do ácido fumarprotocetrárico sobre a produção de MCP-1 por *pool* de macrófagos peritoneais de camundongos Swiss.

Produção de MCP-1 (pg/mL)						
Grupos						
	RPMI	LPS	DMSO	10 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL
<i>Pool 1</i>	79,914	889,008	775,906	382,394	445,233	307,695
<i>Pool 2</i>	52,600	675,997	1021,311	370,896	479,336	623,618
<i>Pool 3</i>	28,062	775,340	700,311	362,416	424,261	403,261

Tabela 11. Efeito do ácido fumarprotocetrárico sobre a produção de FNT por *pool* de macrófagos peritoneais de camundongos Swiss.

Produção de FNT (pg/mL)						
Grupos						
	RPMI	LPS	DMSO	10 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL
<i>Pool 1</i>	22,045	82,352	134,461	90,859	97,783	107,502
<i>Pool 2</i>	15,891	96,335	124,018	170,351	94,698	93,159
<i>Pool 3</i>	87,100	88,707	90,596	87,100	88,035	78,363